

#2

PCT/JP03/05464

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

28.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年 4月26日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2002-127677

[ST.10/C]:

[JP2002-127677]

REC'D 20 JUN 2003	
WIPO	PCT

出 願 人  
Applicant(s):

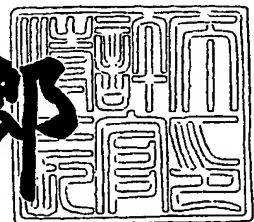
麒麟麦酒株式会社  
独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



Best Available Copy

出証番号 出証特2003-3041552

【書類名】	特許願
【整理番号】	P02-0194
【提出日】	平成14年 4月26日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 1/16 C12P 21/00
【発明の名称】	哺乳類型糖鎖生産メチロトロフ酵母
【請求項の数】	80
【発明者】	
【住所又は居所】	群馬県前橋市総社町1-2-2 麒麟麦酒株式会社 医 薬開発研究所内
【氏名】	小林 和男
【発明者】	
【住所又は居所】	群馬県前橋市総社町1-2-2 麒麟麦酒株式会社 医 薬開発研究所内
【氏名】	北川 義康
【発明者】	
【住所又は居所】	群馬県高崎市宮原町3 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研 究所内
【氏名】	米田 俊浩
【発明者】	
【住所又は居所】	群馬県高崎市宮原町3 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研 究所内
【氏名】	川島 永子
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総 合研究所 つくばセンター内
【氏名】	地神 芳文

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内

【氏名】 千葉 靖典

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100112346

【弁理士】

【氏名又は名称】 内藤 由美

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 16,800円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 80/100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809317

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 哺乳類型糖鎖生産メチロトロフ酵母

【特許請求の範囲】

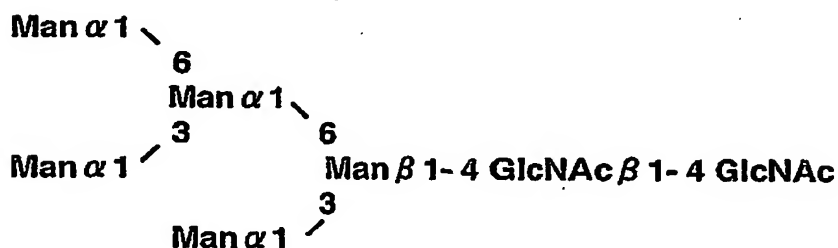
【請求項1】 哺乳類型糖鎖を製造し得るメチロトロフ酵母（メタノール資化性酵母）の作製方法であって、

- 1) メチロトロフ酵母における $\alpha$ -1,6-マンノシルトランスフェラーゼをコードするOCH1遺伝子を破壊する工程、及び
- 2)  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、を含む、上記方法。

【請求項2】 哺乳類型糖鎖が下記構造式 ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) によって示される、請求項1に記載の方法。

【化1】

## 構造式2



【請求項3】 メチロトロフ酵母が Pichia、Hansenulla、Candida、または Ogataea 属に属する酵母である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 メチロトロフ酵母が Ogataea minuta である請求項3に記載の方法。

【請求項5】 メチロトロフ酵母が Ogataea minuta IF010746株由来の株である請求項4に記載の方法。

【請求項6】  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子をメタノール誘導性プロモーターの制御下において発現させる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ（AOX）遺伝子のプロモーターである請求項6に記載の方法。

【請求項8】 導入する $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子に酵母小胞体（ER）滞留シグナル（HEDL）を付加することを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

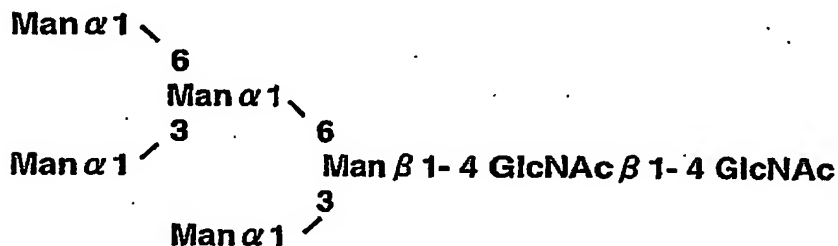
【請求項9】  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子が Aspergillus saitoi 由来の遺伝子である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法によって作製されるメチロトロフ酵母。

【請求項11】 下記構造式：

【化2】

## 構造式2



によって示される哺乳類型糖鎖をN型糖鎖の80%以上含有する請求項10に記載のメチロトロフ酵母。

【請求項12】 請求項10または11に記載のメチロトロフ酵母を用いて、哺乳類型糖鎖を生産する方法。

【請求項13】 請求項10または11に記載のメチロトロフ酵母に目的の糖蛋白質をコードする遺伝子を導入して発現させた形質転換酵母株。

【請求項14】 発現ベクターを用いて遺伝子を導入して発現させた、請求項13記載の形質転換酵母株。

【請求項15】 発現ベクターがメタノール誘導性プロモーターを含む、請

求項 14 記載の形質転換酵母株。

【請求項 16】 メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子由来のものである、請求項 15 記載の形質転換酵母株。

【請求項 17】 発現ベクターがグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子由来のプロモーターを含む、請求項 14 記載の形質転換酵母株。

【請求項 18】 請求項 13～17 のいずれか 1 項に記載の形質転換酵母株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を生産する方法。

【請求項 19】 請求項 18 に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質。

【請求項 20】 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質が哺乳類由来である請求項 19 に記載の糖蛋白質。

【請求項 21】 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質がヒト由来である請求項 20 に記載の糖蛋白質。

【請求項 22】 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質が抗体及びその断片である、請求項 19～21 のいずれか 1 項に記載の糖蛋白質。

【請求項 23】 実質的に配列番号 16 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、URA3 遺伝子 DNA。

【請求項 24】 実質的に配列番号 15 で示される塩基配列からなる URA 3 遺伝子 DNA。

【請求項 25】 請求項 23 または 24 記載の遺伝子が破壊された Ogataea minuta 株。

【請求項 26】 実質的に請求項 23 または 24 記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

【請求項 27】 請求項 26 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 28】 請求項 27 記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

【請求項 2 9】 実質的に配列番号 2 8 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、ADE1遺伝子DNA。

【請求項 3 0】 実質的に配列番号 2 7 で表される塩基配列からなるADE1遺伝子DNA。

【請求項 3 1】 請求項 2 9 または 3 0 記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

【請求項 3 2】 更に請求項 2 9 または 3 0 記載の遺伝子が破壊された請求項 2 5 に記載のOgataea minuta株。

【請求項 3 3】 実質的に請求項 2 9 または 3 0 記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

【請求項 3 4】 請求項 3 3 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 3 5】 請求項 3 4 記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

【請求項 3 6】 実質的に配列番号 4 3 に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、 $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子をコードするOCH1遺伝子DNA。

【請求項 3 7】 実質的に配列番号 4 2 で示される塩基配列からなるOCH1遺伝子DNA。

【請求項 3 8】 請求項 3 6 または 3 7 記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

【請求項 3 9】 更に請求項 3 6 または 3 7 記載の遺伝子が破壊された請求項 2 5 に記載のOgataea minuta株。

【請求項 4 0】 更に請求項 3 6 または 3 7 記載の遺伝子が破壊された請求項 3 2 に記載のOgataea minuta株。

【請求項 4 1】 実質的に配列番号 5 2 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、プロテイナーゼA (PEP4) 遺伝子DNA。

【請求項 4 2】 実質的に配列番号 5 1 で表される塩基配列からなるプロテ

イナーゼA (PEP4) 遺伝子DNA。

【請求項43】 実質的に配列番号58で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、プロテイナーゼB PrB遺伝子DNA。

【請求項44】 実質的に配列番号57で表される塩基配列からなるプロテイナーゼB (PrB) 遺伝子DNA。

【請求項45】 請求項41または42記載のプロテイナーゼA遺伝子及び／または請求項43または44記載のプロテイナーゼB遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

【請求項46】 プロテイナーゼA及び／またはプロテイナーゼBのプロテアーゼ活性が喪失された、請求項45に記載のOgataea minuta株。

【請求項47】 更に請求項41若しくは42記載のプロテイナーゼA遺伝子及び／または請求項43若しくは44記載のプロテイナーゼB遺伝子が破壊された、請求項39に記載のOgataea minuta株。

【請求項48】 更に請求項41若しくは42記載のプロテイナーゼA遺伝子及び／または請求項43若しくは44記載のプロテイナーゼB遺伝子が破壊された、請求項40に記載のOgataea minuta株。

【請求項49】 実質的に配列番号64に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、糖鎖形成を触媒する遺伝子をコードするKTR1遺伝子DNA。

【請求項50】 実質的に配列番号63で示される塩基配列からなるKTR1遺伝子DNA。

【請求項51】 請求項49または50記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

【請求項52】 更に請求項49または50記載の遺伝子が破壊された、請求項47に記載のOgataea minuta株。

【請求項53】 更に請求項49または50記載の遺伝子が破壊された、請求項48に記載のOgataea minuta株。

【請求項54】 実質的に配列番号70に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、MNN9遺伝子DNA。

【請求項55】 実質的に配列番号69で示される塩基配列からなるMNN9遺

伝子DNA。

【請求項 5 6】 請求項 5 4 または 5 5 記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

【請求項 5 7】 更に請求項 5 4 または 5 5 記載の遺伝子が破壊された、請求項 4 7 に記載のOgataea minuta株。

【請求項 5 8】 更に請求項 5 4 または 5 5 記載の遺伝子が破壊された、請求項 4 8 に記載のOgataea minuta株。

【請求項 5 9】 更に請求項 5 4 または 5 5 記載の遺伝子が破壊された、請求項 5 2 または 5 3 に記載のOgataea minuta株。

【請求項 6 0】 実質的に配列番号 7 8 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子DNA。

【請求項 6 1】 実質的に配列番号 7 7 で示される塩基配列からなる、アルコールオキシダーゼ遺伝子DNA。

【請求項 6 2】 実質的に配列番号 7 9 で示される塩基配列からなるアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX) のプロモーターを含むDNA。

【請求項 6 3】 実質的に配列番号 8 0 で示される塩基配列からなる、アルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX) のターミネーターを含むDNA。

【請求項 6 4】 請求項 6 2 記載のプロモーター、異種遺伝子、及び請求項 6 3 記載のターミネーターを含む遺伝子発現カセット。

【請求項 6 5】 請求項 6 4 記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

【請求項 6 6】 請求項 6 5 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 6 7】 請求項 2 5、3 1、3 2、3 8～4 0、4 7、4 8、5 2、5 3、及び 5 7～5 9 のいずれか 1 項に記載のOgataea minuta株を宿主として得られる、請求項 6 6 に記載の形質転換体。

【請求項 6 8】 請求項 6 6 または 6 7 に記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

【請求項69】 実質的に配列番号6で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子DNA。

【請求項70】 実質的に配列番号5で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子DNA。

【請求項71】 実質的に配列番号7で示される塩基配列からなるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (GAPDH) のプロモーターを含むDNA。

【請求項72】 実質的に配列番号8で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子 (GAPDH) のターミネーターを含むDNA。

【請求項73】 請求項71記載のプロモーター、異種遺伝子、及び請求項72記載のターミネーターを含む遺伝子発現カセット。

【請求項74】 請求項73記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

【請求項75】 請求項74記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

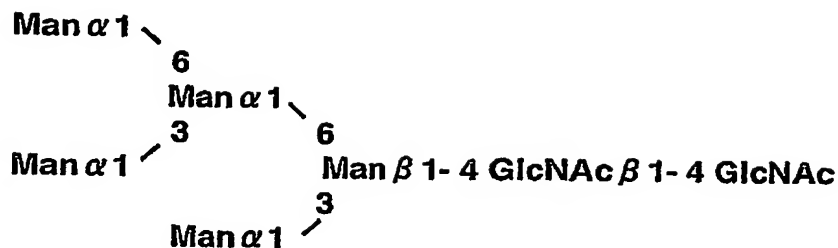
【請求項76】 請求項25、31、32、38～40、47、48、52、53、及び57～59のいずれか1項に記載の *Ogataea minuta* 株を宿主として得られる、請求項75に記載の形質転換体。

【請求項77】 請求項75または76に記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

【請求項78】 哺乳類型糖鎖が下記構造式 (Man5 GlcNAc2) :

【化 3】

構造式 2



によって示される、哺乳類型糖鎖を製造し得る Ogataea minuta 株の作成方法であって、

1) Ogataea minuta における糖鎖生合成酵素遺伝子である OCH1 及び KTR1 遺伝子を破壊する工程、

2) Ogataea minuta におけるプロテアーゼ遺伝子である PEP4 及び PRB1 遺伝子を破壊する工程、

3)  $\alpha$ -1,2マンノシダーゼ遺伝子を Ogataea minuta におけるアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーターにて発現させる工程、

4) 異種遺伝子を Ogataea minuta におけるアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーターにて発現させる工程、及び

5) Ogataea minuta における URA3 栄養要求マーカー、Ogataea minuta における ADE1 の栄養要求マーカー、G418 耐性マーカーの群から選ばれるマーカーを含む発現ベクターによって Ogataea minuta を形質転換させる工程、を含む、上記方法。

【請求項 79】 請求項 78 に記載の方法によって作製される Ogataea minuta 株。

【請求項 80】 請求項 79 に記載の Ogataea minuta 株によって哺乳類型糖鎖を生産する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】



## 【発明の属する技術分野】

本発明は、メチロトロフ酵母を用いてアスパラギン残基に哺乳類細胞の生産する糖鎖と同一の糖鎖構造を有する抗原性のない哺乳類型糖蛋白質を大量に製造する方法を提供する。より詳細には、本発明は、メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株に強力なプロモーターの支配下にて $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を小胞体（ER）に導入・高発現させることによって作成された、哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質生産能を持つ新規な酵母変異株、及び該変異株に目的の糖蛋白質遺伝子を導入したメチロトロフ酵母細胞を培地に培養し、その培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を得ることを特徴とする、哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の製造方法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

酵母は外来蛋白質の生産宿主としても形質転換系の確立に伴い、盛んに検討されてきた。酵母を外来蛋白質生産の場として利用する利点としては、分子遺伝学的操作並びに培養が、原核生物なみに容易である上に、糖鎖付加を始めとした翻訳後の蛋白質修飾を行う真核生物型の機能を有していることが挙げられる。しかしながら、Saccharomyces cerevisiaeを用いた蛋白質生産は一部の例外的な成功例を除いて生産量が低く、Saccharomyces cerevisiae以外の酵母を用いた外来蛋白質生産の系が開発されてきた。例えばShizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、メチロトロフ酵母等の系などである。

## 【0003】

メチロトロフ酵母（メタノール資化性酵母；methylophilic yeast；methanol-utilizing yeast）は、メタノールを単一の炭素源として生育することができる酵母で、外来蛋白質生産宿主として最も開発されている（K.Wolf編「Nonconventional Yeasts in Biotechnology」（1996））。その理由としては、工業レベルの培養法が確立されていること、メタノールによって制御される強力なプロモーターを有していることが挙げられる。メチロトロフ酵母が発見されたころ、SCP（Single Cell Protein）としての利用が研究された結果、安価（無機塩、微量元素、ビオチン、炭素源からなる）培地で、乾燥菌体重量100g/L以上の高密度培養技

術が確立された。

【0004】

C1化合物代謝経路の解明や、その応用利用に関する研究の結果、メタノール代謝に必要な酵素群は炭素源によって厳密に調節されていることが明らかになった。メタノール資化性酵母におけるメタノール代謝は、最初の反応として、アルコールオキシダーゼによりメタノールと酸素からホルムアルデヒドと過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素はカタラーゼにより水と酸素に分解される。一方、ホルムアルデヒドは、ホルムアルデヒド脱水素酵素、S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ及びアルコールオキシダーゼの作用により、二酸化炭素まで酸化され、その際に生じるNADHは細胞のエネルギー源として利用される。それと同時に、ホルムアルデヒドはジヒドロキシアセトンシンターゼによりキシルロース-5-リン酸と縮合し、グリセルアルデヒド-3-リン酸とジヒドロキシアセトンへと変換され、その後ペントースリン酸経路を経て菌体構成成分となる。

【0005】

これらのアルコール酸化酵素、ジヒドロキシアセトン合成酵素、ギ酸脱水素酵素はグルコースで培養した菌体では検出されないが、メタノールで培養した菌体には、それぞれ菌体内蛋白質の数10%を占めるまでに誘導される。これら酵素の生産は転写レベルで制御されるため、これらをコードする遺伝子のプロモーターの支配下で目的とする外来遺伝子の誘導発現が可能となる。メタノール代謝酵素遺伝子プロモーターを用いた外来遺伝子発現系は生産量の点で酵母発現系のなかでも最も高く評価されており、菌体内発現では総蛋白質の数10%程度、分泌の場合で培地中に数g/Lまで発現した例もある。

【0006】

現在のところ、メチロトロフ酵母で形質転換系及び外来遺伝子発現系が確立しているのは、*Ocandida boidinii*、*Hansenula polymorpha*、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolica*の4種である。それぞれの発現系において使用コドン頻度、発現調節、発現プラスミドの組み込み様式の点で差が認められ、それぞれの発現系の特色となっている。

【0007】

ところで自然界に存在する蛋白質には、アミノ酸のみからなる単純蛋白質と、糖鎖や脂質、リン酸などが結合した複合蛋白質の2種類があり、サイトカイン類に関してはそのほとんどが糖蛋白質であることが知られている。近年、糖鎖の構造については、レクチンを用いた解析等の従来の方法に加え、HPLCやNMR、FAB-MSを用いた新しい分析法等が開発され、次々と新しい糖蛋白質の糖鎖構造が解明されてきている。一方、糖鎖の機能解析の研究により、糖鎖は細胞間認識、分子識別、蛋白質の構造維持や活性への寄与、生体内でのクリアランス、分泌、局在化など多くの生体内機構に重要な役割を担っていることがわかってきた。

#### 【0008】

例えば、エリスロポエチン (EPO) や組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA) などについては、その糖鎖を除くと本来の生物活性を示さなくなることが明らかにされてきた (木幡陽、蛋白質核酸酵素、36, 775-788 (1991))。遺伝子組換え体動物細胞を宿主として生産された史上初の糖蛋白質型医薬品となったエリスロポエチンについては、その糖鎖の重要性が指摘されている。エリスロポエチンの糖鎖は受容体との結合には阻害的に働くが、活性構造の保持、および体内動態の改善に決定的な寄与があり、全体として薬理活性の発現に必要不可欠であることが示された (Takeuchi and Kobata, *Glycobiology*, 1, 337-346 (1991))。更に、糖鎖の構造、種類、分岐数 (Man3GlcNAc2に結合するGlcNAcによって形成される枝分かれの数) とエリスロポエチンの薬理効果との間に強い相関性が見いだされた (Takeuchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7819-7822 (1989))。分岐構造の発達していないエリスロポエチンでは腎でのクリアランスが早まり、結果として体内滞留時間が短くなることがこの現象の主な原因であると報告されている (Misaizu et al., *Blood*, 86, 4097-4104 (1995))。これに似た例はフェツインなどの血清糖蛋白質でも見られ、糖鎖の末端のシアル酸を除去することでガラクトースが露出すると、肝細胞表面のレクチンによって認識され、血中から速やかに消失してしまうことが見いだされている (Ashwell and Harford, *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 531-554 (1982); Morell et al., *J. Biol. Chem.*, 243, 155-159 (1968))。

#### 【0009】

糖蛋白質の糖鎖には、大別して、Asn結合型（N型）、ムチン型、O-GlcNAc型、GPIアンカー型、プロテオグリカン型などがあり（竹内誠、グリコバイオロジーシリーズ5、グリコテクノロジー、木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編、講談社サイエンティフィック、191-208（1994））、それぞれ固有の生合成経路を持ち、個別の生理機能を担っている。このうち、Asn結合型糖鎖の生合成経路については多くの知見があり、詳しく解析されている。

## 【0010】

Asn結合型糖鎖の生合成は、N-アセチルグルコサミン、マンノース、およびグルコースからなる前駆体が脂質キャリアー中間体の上に合成され、まず小胞体（ER）で糖蛋白質の特定の配列（Asn-X-SerまたはThr）に転移される。次にプロセシング（グルコース残基と特定のマンノース残基の切断）を受け、マンノース8残基とN-アセチルグルコサミン2残基からなるM8ハイマンノース型糖鎖（Man8GlcNAc2）が合成される。このハイマンノース型糖鎖を含有する蛋白質はゴルジ体に輸送されて、種々の修飾を受けるが、このゴルジ体での修飾は酵母と哺乳類で大きく異なっている（Gemmill, T.R., Trimble, R.B., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1426, 227（1999））。

## 【0011】

哺乳類細胞では、多くの場合、ハイマンノース型糖鎖に $\alpha$ -マンノシダーゼ I（ $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ）が作用してマンノース数残基を切断する。この過程で生成する糖鎖（Man5-8GlcNAc2）は、ハイマンノース型と呼ばれる糖鎖である。マンノースが3残基切断されたM5ハイマンノース型糖鎖（Man5GlcNAc2）にN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ（GnT）Iが作用し、N-アセチルグルコサミンを1残基転移し、GlcNAcMan5GlcNAc2からなる糖鎖が生成する。このようにしてできた糖鎖は混成（ハイブリッド）型と呼ばれる。更に、 $\alpha$ -マンノシダーゼII、GnT-IIが作用すると、GlcNAc2Man3GlcNAc2という複合（コンプレックス）型と呼ばれる糖鎖構造となり、これ以降、十数種にもおよぶ糖転移酵素群が作用して、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸等を付加し、多様な哺乳類型糖鎖を形成する（図1）。

## 【0012】

よって本発明で定義される哺乳類型糖鎖とは哺乳類に存在するN型（アスパラギン結合型）糖鎖であって、哺乳類の糖鎖生合成過程において生成される糖鎖である。具体的にはMan8GlcNAc2で示されるM8ハイマンノース型糖鎖、Man8GlcNAc2より $\alpha$ -マンノシダーゼ-Iの作用で生成されるMan5GlcNAc2、Man6GlcNAc2、Man7GlcNAc2で示されるM5、M6、M7ハイマンノース型糖鎖、Man5GlcNAc2よりGlcNAcトランスフェラーゼ-I（GnT-I）の作用により生成されるGlcNAcMan5GlcNAc2で示される混成型糖鎖、更にGlcNAcMan5GlcNAc2より $\alpha$ -マンノシダーゼ-I、GlcNAcトランスフェラーゼ-II（GnT-II）の作用により生成されるGlcNAc2Man3GlcNAc2で示される2本鎖複合型糖鎖、更にGlcNAc2Man3GlcNAc2よりガラクトシルトランスフェラーゼ（GalT）の作用により生成されるGal2GlcNAc2Man3GlcNAc2で示される2本鎖複合型糖鎖を言う。

## 【0013】

哺乳類ではハイマンノース型、混成型、複合型いずれの糖鎖も見られるが、蛋白質によってその結合する糖鎖が異なっていたり、また一つの蛋白質内でも型の異なる糖鎖が結合していたりする。これらの糖鎖は、その型や結合している糖鎖の種類によって糖蛋白質の生合成、細胞内ソーティング、抗原性の隠蔽、生体内安定性、臓器ターゲティング特性などの優れた機能を示す（遠藤玉夫、糖鎖工学、産業調査会、64-72（1992））。

## 【0014】

一方、酵母では、M8ハイマンノース型糖鎖にマンノースが数残基から100残基以上付加した、マンナン型糖鎖（外糖鎖）を生成する。例えばパン酵母、実験酵母として知られる *Saccharomyces cerevisiae* における外糖鎖の生合成は図2で示したような経路で進行すると考えられている（Ballou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3368-3372（1990））。すなわち、M8ハイマンノース型糖鎖にまず $\alpha$ -1,6結合でマンノースが付加する延長開始反応が起こる（図2、反応I，B）。この反応を行なう酵素はOCH1遺伝子にコードされる蛋白質であることが明らかになっている（Nakayama et al., EMBO J., 11, 2511-2519（1992））。更に $\alpha$ -1,6結合でマンノースを逐次延長する反応（図2、II）が起こることにより、外糖鎖の骨格となるポリ $\alpha$ -1,6結合マンノース結合が形成される（図2、E）。こ

の  $\alpha$ -1,6結合のマンノースには、 $\alpha$ -1,2結合したマンノースの分岐が存在し（図2：C, F, H）、この枝分かれした  $\alpha$ -1,2結合のマンノースの先には、更に  $\alpha$ -1,3結合したマンノースが付加することがある（図2：D, G, H, I）。この  $\alpha$ -1,3結合のマンノースの付加は、MNN1遺伝子産物によるものである（Nakanishi-Shindo et al., J. Biol. Chem., 268, 26338-26345 (1993)）。またハイマンノース型糖鎖部分および外糖鎖部分にマンノース-1-リン酸が付加した酸性糖鎖も生成することがわかっている（図2, \*；前記式（I）中の\*に対応するリン酸化可能部位）。この反応はMNN6遺伝子がコードする遺伝子によることがわかり（Wang et al., J. Biol. Chem., 272, 18117-18124 (1997)）、更にこの転位反応を正に制御する蛋白質をコードする遺伝子（MNN4）も明らかとなった（Odani et al., Glycobiology, 6, 805-810 (1996)；Odani et al., FEBS letters, 420, 186-190 (1997)）。

## 【0015】

上記のように酵母をはじめとする微生物を用いた物質生産は、その生産コストの低さや、これまで醗酵工学として培ってきた培養技術など、動物細胞を用いた物質生産に比べると、いくつかの点で有利である。しかしながら、微生物においてはヒト糖蛋白質と同一構造の糖鎖を付加することができないという問題がある。つまり、ヒトを含め動物細胞由来の糖蛋白質は、図1で示したような複合型、さらに混成型およびハイマンノース型の3種類のアスパラギン結合型糖鎖に加え、多種多様のムチン型糖鎖を有しているが、パン酵母（Saccharomyces cerevisiae）でも付加されるアスパラギン結合型糖鎖はハイマンノース型のみで、ムチン型はマンノースのみを主成分とする糖鎖しか付加されない。

## 【0016】

これらの酵母の糖鎖は不均質な蛋白質産物を生成し、蛋白質の精製を困難にしたり、比活性を低下させたりする（Bekkers et al., Biochim. Biophys. Acta, 1089, 345-351 (1991)）。更に糖鎖の構造が大きく異なるため、酵母で生産された糖蛋白質は、哺乳類由来のものと同一の生物活性が検出されなかったり、哺乳類動物などに対して強い免疫原性を有する。このように、哺乳類由来の有用糖蛋白質を生産させる際の宿主としては、酵母は不適当とされており、上述したエリ

スロポエチン等のように糖鎖が重要な機能を持っている糖蛋白質の遺伝子組換え生産には、微生物は適しておらず、実際にエリスロポエチンの生産にはチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞）が用いられている。

## 【0017】

このように糖蛋白質の糖鎖は、その構造が複雑であるだけでなく生物活性の発現に重要な役割を担っていることが予想されるが、糖鎖の構造と生物活性との相関が必ずしも明確でないため、蛋白質部分に付加する糖鎖の構造（糖の種類、結合位置、鎖長など）を自由自在に改変制御できる技術の開発が必要となる。特に医薬品として糖蛋白質を開発する場合にはその構造および機能解析が重要である。その中で哺乳類由来のものと同等の生物活性を持った糖蛋白質、すなわち哺乳類型の糖鎖を含有する糖蛋白質を生産できる酵母の開発が、学会や産業界から望まれている。

## 【0018】

酵母を用いて哺乳類型糖鎖を生産するためには、まず、前記のような酵母特有の糖蛋白質糖鎖の修飾であるマンノースを多数付加するような反応がおこらず、外糖鎖が付加しなくなり、糖鎖合成がM5ハイマンノース型糖鎖を生成するような糖鎖生合成系を有する変異株を育種することが重要となる。次に、この哺乳類型糖鎖の前駆体であるM8ハイマンノース型糖鎖に、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を上記酵母変異株に導入することにより達成されるはずである。

## 【0019】

そこで、以前より外糖鎖が欠失した糖蛋白質を得るために、酵母外糖鎖生合成系酵素群の欠損株の使用がSaccharomyces cerevisiaeを中心に検討されてきている。欠損株を得るためには、薬剤や紫外線照射、自然変異により遺伝子突然変異株を取得する場合と、人為的に標的遺伝子を破壊する方法がある。

## 【0020】

前者についてはこれまで様々な報告がある。例えば、mnn2変異株は外糖鎖の $\alpha$ -1,6骨格から $\alpha$ -1,2結合を生じる枝分かれのステップに欠損があり、mnn1変異株は分岐先端に $\alpha$ -1,3結合のマンノースを生成するステップに欠損がある。しかし、これらの変異株は外糖鎖の骨格である $\alpha$ -1,6マンノース結合には欠損がないた

め、いずれも鎖長の長い外糖鎖を生成する。また mnn7, 8, 9, 10 変異株などは  $\alpha$ -1,6 マンノース結合を4-15分子程度しか持たない変異株として単離されているが、これらの変異株も外糖鎖が短くなるだけであり、ハイマンノース型糖鎖で糖鎖伸長が停止するものではない (Ballou et al., J. Biol. Chem., 255, 5986-5991 (1980) ; Ballou et al., J. Biol. Chem., 264, 11857-11864 (1989) )。外糖鎖の付加欠損は、小胞体からゴルジ体への蛋白質輸送が温度感受性となった sec18 などの分泌変異株などでも観察される。しかし、sec 変異株では、蛋白質の分泌そのものが高温で阻害されてしまうため、糖蛋白質の分泌生産という目的にはそぐわない。

## 【0021】

よって、これらの変異株は目的のハイマンノース型糖鎖を完全には生合成できないため、哺乳類型糖鎖を生成するための宿主酵母としては不適であると考えられる。

## 【0022】

一方、後者については近年の遺伝子工学的手法の発達により、標的遺伝子を複数個破壊した欠損株を構築できるようになった。まず、試験管内での操作により、プラスミド上の標的遺伝子DNAを分断あるいは部分欠失させ、そこに適当な選択マーカー遺伝子DNAを挿入して標的遺伝子の上流部と下流部の間に選択マーカーがサンドイッチされた構造体を作製する。次に、この構造を持つ線状DNAを酵母細胞に導入することにより、導入断片の両端と染色体上の標的遺伝子との相同部分の間で2回の組み換えを起こし、選択マーカーを挟み込んだDNA構成体で置換するものである (Rothstein, Methods Enzymol., 101, 202-211 (1983))。

## 【0023】

外糖鎖を欠損した酵母株の分子育種は地神らにより既に特開平6-277086や特開平9-266792に記載されている。地神らはこの  $\alpha$ -1,6結合マンノースの伸長の鍵酵素であると考えられている S. cerevisiae の OCH1 遺伝子 ( $\alpha$ -1,6-mannosyltransferaseを発現する) のクローニングに成功した。この OCH1 遺伝子の破壊株 ( $\Delta o ch1$ ) の糖蛋白質には、Man8GlcNAc2、Man9GlcNAc2、Man10GlcNAc2の3種の糖鎖が付加されており、このうちMan8GlcNAc2糖鎖は、S. cerevisiae と哺乳類細胞



とで共通するERコア糖鎖と同一の構造(図2中Aで記載した構造)で、Man9GlcNAc2、Man10GlcNAc2の糖鎖は、このERコア糖鎖に $\alpha$ -1,3結合マンノースが付加された構造 [Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y. and Jigami, Y., (1994), J. Biol. Chem.] であった。さらに、 $\Delta$ och1mnn1二重変異株を作製して末端の $\alpha$ -1,3結合マンノース転移を阻害することにより、S. cerevisiae と哺乳類細胞で共通するERコア糖鎖と同一構造のMan8GlcNAc2糖鎖のみを付加するS. cerevisiae 宿主を作製できた。この $\Delta$ och1mnn1二重変異株は、ハイマンノース型糖鎖を有する哺乳類由来の糖蛋白質を遺伝子組換え技術により生産する際に有用な宿主となると考えられている [地神芳文(1994)蛋白質・核酸・酵素, 39, 657]。

#### 【0024】

しかし、特開平6-277086に記載された二重変異株( $\Delta$ och1 $\Delta$ mnn1)で生産された糖蛋白質糖鎖には、リン酸残基を持つ酸性糖鎖が含まれていることがわかった。この酸性糖鎖はヒトなど哺乳類由来の糖鎖には存在しない構造であり、哺乳類の体内で異物と認識されて、抗原性を示すと思われる (Ballou, Methods Enzymol., 185, 440-470 (1990))。そこで、更にマンノース-1-リン酸転移を正に制御する遺伝子(MNN4)およびO-結合型糖鎖の延長反応を行なうマンノース転移酵素遺伝子(KRE2)の機能を破壊した四重変異株(特開平9-266792に記載)が構築された。これに記載された酵母株の生産する糖蛋白質の糖鎖は、目的のM8ハイマンノース型糖鎖を有していることが明らかとなった。更に千葉らはこの酵母特有の糖鎖生合成系に関わる遺伝子を破壊した酵母にAspergillus saitoi由来の $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入した株は、マンノースが1~数残基切断されたハイマンノース型糖鎖(Man5-8GlcNAc2)を有することが明らかとなっている (Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))。また更にこの育種された株に哺乳類の糖鎖生合成系に関わる遺伝子を導入することで、酵母により哺乳類型糖蛋白質を生産する試みを行っている (PCT/JP00/05474)。しかしながら開示された知見では構成発現プロモーターとしては最も発現量の高いと言われるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の遺伝子のプロモーターを用いて $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現させているにもかかわらず、異種蛋白質であるFG

Fではハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) への変換率がほぼ100%であるのに対して、細胞壁由来のマンノプロテイン、及びカルボキシペプチダーゼY (CPY) のMan5GlcNAc2への変換効率は、10~30%と低く、種々の糖蛋白質への応用という面では十分であるとは言い難い。

## 【 0 0 2 5 】

また別途1994年、SchwientekらはS. cerevisiae でヒト由来 $\beta$ -1,4-galactosyltransferase遺伝子の活性発現について報告しており [Schwientek, T. and Ernst, J.F., Gene, 145, 299 (1994)]、Krezdrn らも同じくS. cerevisiae でヒト由来 $\beta$ -1,4-galactosyltransferase及び $\alpha$ -2,6-sialyltransferaseの活性発現を行っている [Krezdrn, C.H., et al., Eur. J. Biochem. 220, 809 (1994)]。

## 【 0 0 2 6 】

しかしながら、これらの知見を他の酵母に応用しようとした場合、種々の問題点が生じてくる。まず酵母と一言にいても、様々な糖鎖構造を有することが知られている (Nonconventional Yeasts in Biotechnology, (1995) K.Wolfら)。

## 【 0 0 2 7 】

例えば、分裂酵母Schizosaccharomyces pombeはガラクトースを含有する。Kluyveromyces lactisはGlcNAcを有する。メチロトロフ酵母Pichia pastorisや、病原性酵母であるCandida albicansは $\beta$ マンノシド結合を有する糖鎖が確認されている。またキシロース、ラムノースを糖鎖構成成分として有する酵母も存在している (Biochim. et Biophys. Acta, 1426 1999, 227-237)。

## 【 0 0 2 8 】

事実、地神らの報告にあるSaccharomyces cerevisiae以外、哺乳類型糖鎖を生産する酵母は得られておらず、外来蛋白質生産の宿主として有用であるメチロトロフ酵母に関しては、特開平9-3097の例が挙げられるが、その他はほとんど存在していない。

## 【 0 0 2 9 】

特開平9-3097ではPichia pastorisのOCH1遺伝子ホモログ、及びその破壊株を得て天然型メチロトロフ酵母株に比して糖鎖伸長能が抑制されてなる修飾メチロ

トロフ酵母株を作成しているが、生産された糖蛋白質のSDS-PAGEの情報しかなく、構造解析などの根拠がない。つまり $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼである可能性について指摘しているだけで、実際に活性を同定しているわけではない。事実、Saccharomyces cerevisiaeにおいてもOCH1遺伝子ホモログであるHOC1遺伝子（GenBank登録番号；U62942）が存在するが、現在のところその活性、機能は不明である。

## 【0030】

またP.pastorisにおいては $\beta$ マンノシド結合を有する糖鎖が確認されており、その構造については何ら記載がない。実際に糖鎖構造解析を行って、生成した糖鎖は同定されていないので、取得した遺伝子が実際にOCH1遺伝子であるかどうか、また更に破壊株の糖鎖が哺乳類型となったという証明はなされておらず、特開平9-3097により開示された技術では哺乳類型糖鎖糖蛋白質を作成するとは言えず。医薬品生産に適應できる生産系としては十分であると言い難い。

## 【0031】

また、酵母以外の微生物を利用した哺乳類型糖鎖の生産に関する試みとして、Marasらによる糸状菌Trichoderma reeseiを用いた検討がある（US5,834,251）。これは糸状菌、酵母に $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ、GnT-Iを作用させハイブリッド型糖鎖（GN1Man5型糖鎖）を合成すると言ったものである。

## 【0032】

糸状菌は元々 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを発現しており、その結果酵母と比較して糖鎖修飾が少ないと言われている。一方酵母には特有の外糖鎖が付加されるので、該手法のように $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼのみを導入しただけでは、全ての糖鎖がMan5にはならない。事実、該特許に開示されているSaccharomyces cerevisiaeにおいても上記地神、千葉らの知見にあるように外糖鎖合成遺伝子OCH1の作用により最終生成物であるMan5と部分分解物であるMan6以上の糖鎖の混合物になり、哺乳類型糖鎖を生成しているとは言い難く、よって酵母の糖鎖生合成遺伝子の破壊なしには目的を達成できることはない。Marasらはこれら酵母特有の糖鎖生合成系の遺伝子破壊については全く言及しておらず、該手法が酵母（Pichia pastoris, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae

iae, Yarrowia lipolytica) まで適応できないことは自明である。また Marasらは実施例の中で異種発現蛋白質として RNaseB を挙げているが、RNaseB は本来 Man5 または Man6 のハイマンノース型糖鎖を有するものである。動物細胞由来の糖鎖の多くは複雑な構造を有する複合型糖鎖であり、医薬品などへの応用が期待されているサイトカインなどの糖蛋白質の多くは複合型糖鎖を有する。事実、発現する外来糖蛋白質の種類によってその糖鎖構造が大きく異なる事が知られている (Method in Molecular Biology 103, 1998, 95-105)。よって複合型糖鎖を有する糖蛋白質への応用について元々ハイマンノース型糖鎖を有する糖蛋白質である RNaseB を例とするのは不適であると考えられる。

## 【0033】

また更に糸状菌は工業用酵素、食品酵素の製造などによく用いられ、形質転換系も整備されてきており、組換え技術による酵素生産も行われている。しかし 1) プロテアーゼ活性が非常に強い為、できた蛋白が限定分解を受けやすい、2) 菌体外に多くの分泌蛋白を生産するため、均一性が求められる蛋白性医薬品の生産には不適である。

## 【0034】

なお本発明における Ogataea minuta はもと Pichia minuta または Hansenula minuta と称されていた株で、緒方らにより Ogataea minuta と命名された (Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 58, 1245-1257 (1994))。 Ogataea minuta は他のメチロトロフ酵母同様、メタノールによる誘導時にアルコール酸化酵素、ジヒドロキシアセトン合成酵素、ギ酸脱水素酵素を菌体内に著量生産するが、これらのメタノール資化に関する遺伝子についての情報、更に該酵母の糖鎖構造については全く知られていない。

## 【0035】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、酵母での糖蛋白質の生産における上記の問題を克服し、ヒトおよび他の哺乳類細胞において付加されるのと同じの糖鎖構造をもつ、抗原性のない有用な哺乳類型糖鎖、および該糖鎖を含有する糖蛋白質を、メチロトロフ酵母を用いて大量に製造する方法を提供することにある。

【0036】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者らはメチロトロフ酵母を用いた哺乳類細胞適応型糖鎖構造を有する糖蛋白質生産技術の構築を目的に、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、メチロトロフ酵母の一種であるOgataea minutaの糖鎖が主に $\alpha$ -1,2マンノシド結合よりなることを、細胞壁糖鎖のNMR解析、及び $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼ消化試験により見出し、Ogataea minutaの糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株（M8ハイマンノース型糖鎖に $\alpha$ -1,6結合でマンノースが順次結合する伸張反応のキー酵素と考えられるOCH1遺伝子（ $\alpha$ -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ）破壊株など）にメタノール誘導性プロモーターなどの強力なプロモーターの支配下にて $\alpha$ 1,2-マンノシダーゼを導入・発現させ、更に目的の糖蛋白質遺伝子を導入したOgataea minutaを培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質が得られることを見出し本発明に至った。つまりSaccharomyces cerevisiaeにおけるMNN1遺伝子、MNN4遺伝子を破壊することなく、哺乳類型糖鎖を生産することができることを見出した。

【0037】

すなわち、本発明は、

- 1) メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株（M8ハイマンノース型糖鎖に $\alpha$ -1,6結合でマンノースが順次結合する伸張反応のキー酵素と考えられるOCH1遺伝子（ $\alpha$ -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ）破壊株など）にメタノール誘導性プロモーターなどの強力なプロモーターの支配下にて $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを導入・発現させることによって得られる哺乳類型糖鎖を産生するメチロトロフ酵母株。
  - 2) また該糖鎖生合成変異酵母株を用いて、これに目的の糖蛋白質をコードする遺伝子を導入発現させた酵母株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を生産する方法。
  - 3) 更に該生産法により製造される哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質。
- である。

【0038】

より具体的には、本発明は以下の(1)～(80)を提供する。

(1) 哺乳類型糖鎖を製造し得るメチロトロフ酵母(メタノール資化性酵母)の作製方法であって、

1) メチロトロフ酵母における $\alpha$ -1,6-マンノシルトランスフェラーゼをコードするOCH1遺伝子を破壊する工程、及び

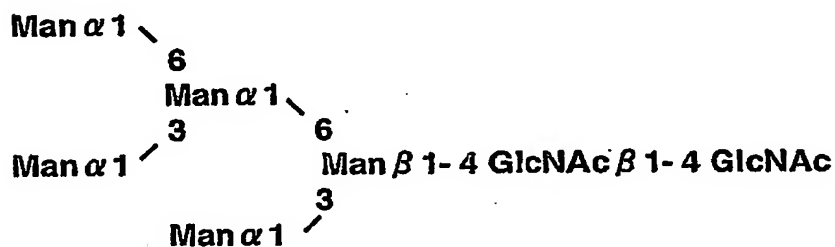
2)  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入して発現させる工程、を含む、上記方法。

【0039】

(2) 哺乳類型糖鎖が下記構造式( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ )によって示される、上記(1)に記載の方法。

【化4】

#### 構造式2



【0040】

(3) メチロトロフ酵母が Pichia、Hansenulla、Candida、または Ogataea 属に属する酵母である上記(1)または(2)に記載の方法。

(4) メチロトロフ酵母が Ogataea minuta である上記(3)に記載の方法。

(5) メチロトロフ酵母が Ogataea minuta IF010746株由来の株である上記(4)に記載の方法。

(6)  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子をメタノール誘導性プロモーターの制御下において発現させる、上記(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子のプロモーターである上記(6)に記載の方法。

(8) 導入する $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子に酵母小胞体(ER)滞留シグナル(HEDL)を付加することを特徴とする、上記(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9)  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子が Aspergillus saitoi 由来の遺伝子である、上記(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

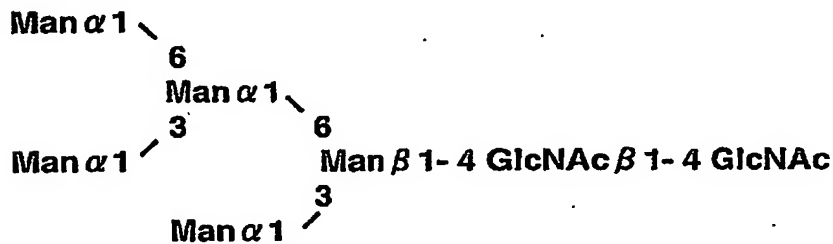
(10) 上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法によって作製されるメチロトロフ酵母。

【0041】

(11) 下記構造式：

【化5】

## 構造式2



によって示される哺乳類型糖鎖をN型糖鎖の80%以上含有する上記(10)に記載のメチロトロフ酵母。

【0042】

(12) 上記(10)または(11)に記載のメチロトロフ酵母を用いて、哺乳類型糖鎖を生産する方法。

(13) 上記(10)または(11)に記載のメチロトロフ酵母に目的の糖蛋白質をコードする遺伝子を導入して発現させた形質転換酵母株。

(14) 発現ベクターを用いて遺伝子を導入して発現させた、上記(13)記載の形質転換酵母株。

【0043】

(15) 発現ベクターがメタノール誘導性プロモーターを含む、上記(14)

記載の形質転換酵母株。

(16) メタノール誘導性プロモーターがアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子由来のものである、上記 (15) 記載の形質転換酵母株。

(17) 発現ベクターがグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子由来のプロモーターを含む、上記 (14) 記載の形質転換酵母株。

(18) 上記 (13) ~ (17) のいずれかに記載の形質転換酵母株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を生産する方法。

(19) 上記 (18) に記載の方法によって生産される哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質。

【0044】

(20) 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質が哺乳類由来である上記 (19) に記載の糖蛋白質。

(21) 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質がヒト由来である上記 (20) に記載の糖蛋白質。

(22) 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質が抗体及びその断片である、上記 (19) ~ (21) のいずれかに記載の糖蛋白質。

(23) 実質的に配列番号 16 で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、URA3 遺伝子 DNA。

(24) 実質的に配列番号 15 で表される塩基配列からなる URA 3 遺伝子 DNA。

(25) 上記 (23) または (24) 記載の遺伝子が破壊された Ogataea minuta 株 (ura3Δ : TK1-3)。

【0045】

(26) 実質的に上記 (23) または (24) 記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

(27) 上記 (26) 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

(28) 上記 (27) 記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。



(29) 実質的に配列番号28で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、ADE1遺伝子DNA。

(30) 実質的に配列番号27で表される塩基配列からなるADE1遺伝子DNA。

【0046】

(31) 上記(29)または(30)記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株 (adelΔ)。

(32) 更に上記(29)または(30)記載の遺伝子が破壊された上記(25)に記載のOgataea minuta株 (ura3ΔadelΔ:TK4-1)。

(33) 実質的に上記(29)または(30)記載の遺伝子またはその断片を選択マーカーとして含む組換え発現ベクター。

(34) 上記(33)記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

(35) 上記(34)記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

【0047】

(36) 実質的に配列番号43に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、 $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子をコードするOCH1遺伝子DNA。

(37) 実質的に配列番号42で示される塩基配列からなるOCH1遺伝子DNA。

(38) 上記(36)または(37)記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株 (och1Δ)。

(39) 更に上記(36)または(37)記載の遺伝子が破壊された上記(25)に記載のOgataea minuta株 (och1Δura3Δ:TK3-A)。

(40) 更に上記(36)または(37)記載の遺伝子が破壊された上記(32)に記載のOgataea minuta株 (och1Δura3ΔadelΔ:TK5-3)。

【0048】

(41) 実質的に配列番号52で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、プロテイナーゼA (PEP4) 遺伝子DNA。

(42) 実質的に配列番号51で表される塩基配列からなるプロテイナーゼA (PEP4) 遺伝子DNA。

(43) 実質的に配列番号58で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、プロテイナーゼB PrB遺伝子DNA。

(44) 実質的に配列番号57で表される塩基配列からなるプロテイナーゼB (PrB) 遺伝子DNA。

(45) 上記(41)または(42)記載のプロテイナーゼA遺伝子及び／または上記(43)または(44)記載のプロテイナーゼB遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

【0049】

(46) プロテイナーゼA及び／またはプロテイナーゼBのプロテアーゼ活性が喪失された、上記(45)に記載のOgataea minuta株。

(47) 更に上記(41)若しくは(42)記載のプロテイナーゼA遺伝子及び／または上記(43)若しくは(44)記載のプロテイナーゼB遺伝子が破壊された、上記(39)に記載のOgataea minuta株 (och1Δ pep4Δ ura3Δ : TK6 ; och1Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ : TK8)。

(48) 更に上記(41)若しくは(42)記載のプロテイナーゼA遺伝子及び／または上記(43)若しくは(44)記載のプロテイナーゼB遺伝子が破壊された、上記(40)に記載のOgataea minuta株 (och1Δ pep4Δ ura3Δ ade1Δ : TK7 ; och1Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ ade1Δ : TK9)。

(49) 実質的に配列番号64に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、糖鎖形成を触媒する遺伝子をコードするKTR1遺伝子DNA。

(50) 実質的に配列番号63で示される塩基配列からなるKTR1遺伝子DNA。

【0050】

(51) 上記(49)または(50)記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

(52) 更に上記(49)または(50)記載の遺伝子が破壊された、上記(47)に記載のOgataea minuta株 (och1Δ ktr1Δ pep4Δ ura3Δ ; och1Δ ktr1Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ : TK10)。

(53) 更に上記(49)または(50)記載の遺伝子が破壊された、上記(48)に記載のOgataea minuta株 (och1 $\Delta$ ktr1 $\Delta$ pep4 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ade1 $\Delta$ ; och1 $\Delta$ ktr1 $\Delta$ pep4 $\Delta$ prb1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ade1 $\Delta$ :TK11)。

(54) 実質的に配列番号70に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、MNN9遺伝子DNA。

(55) 実質的に配列番号69で示される塩基配列からなるMNN9遺伝子DNA。

【0051】

(56) 上記(54)または(55)記載の遺伝子が破壊されたOgataea minuta株。

(57) 更に上記(54)または(55)記載の遺伝子が破壊された、上記(47)に記載のOgataea minuta株 (och1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ; och1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ prb1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ :TK12)。

(58) 更に上記(54)または(55)記載の遺伝子が破壊された、上記(48)に記載のOgataea minuta株 (och1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ade1 $\Delta$ ; och1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ prb1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ade1 $\Delta$ :TK13)。

(59) 更に上記(54)または(55)記載の遺伝子が破壊された、上記(52)または(53)に記載のOgataea minuta株 (och1 $\Delta$ ktr1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ; och1 $\Delta$ ktr1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ prb1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ :TK14; och1 $\Delta$ ktr1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ade1 $\Delta$ ; och1 $\Delta$ ktr1 $\Delta$ mnn9 $\Delta$ pep4 $\Delta$ prb1 $\Delta$ ura3 $\Delta$ ade1 $\Delta$ :TK15)。

【0052】

(60) 実質的に配列番号78で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、アルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子DNA。

(61) 実質的に配列番号77で示される塩基配列からなる、アルコールオキシダーゼ遺伝子DNA。

(62) 実質的に配列番号79で示される塩基配列からなるアルコールオキシダーゼ遺伝子(AOX)のプロモーターを含むDNA。

(63) 実質的に配列番号80で示される塩基配列からなる、アルコールオキシダーゼ遺伝子(AOX)のターミネーターを含むDNA。

(64) 上記(62)記載のプロモーター、異種遺伝子、及び上記(63)記

載のターミネーターを含む遺伝子発現カセット。

(65) 上記(64)記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

【0053】

(66) 上記(65)記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

(67) 上記(25)、(31)、(32)、(38)～(40)、(47)、(48)、(52)、(53)、及び(57)～(59)のいずれかに記載の *Ogataea minuta* 株を宿主として得られる、上記(66)に記載の形質転換体。

(68) 上記(66)または(67)に記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

(69) 実質的に配列番号6で示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子DNA。

【0054】

(70) 実質的に配列番号5で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子DNA。

(71) 実質的に配列番号7で示される塩基配列からなるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子(GAPDH)のプロモーターを含むDNA。

(72) 実質的に配列番号8で示される塩基配列からなる、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素遺伝子(GAPDH)のターミネーターを含むDNA。

(73) 上記(71)記載のプロモーター、異種遺伝子、及び上記(72)記載のターミネーターを含む遺伝子発現カセット。

(74) 上記(73)記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。

(75) 上記(74)記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【0055】

(76) 上記(25)、(31)、(32)、(38)～(40)、(47)、(48)、(52)、(53)、及び(57)～(59)のいずれかに記載の *Ogataea minuta* 株を宿主として得られる、上記(75)に記載の形質転換体。

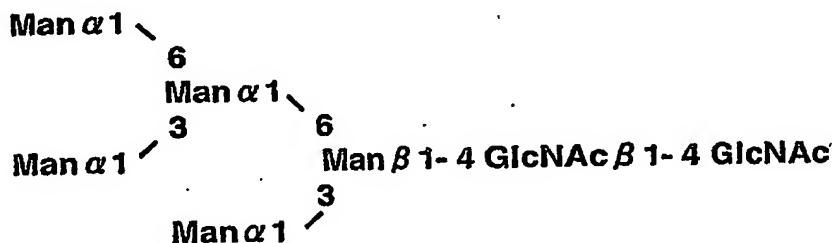
(77) 上記(75)または(76)に記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から異種遺伝子の発現産物を採取することを特徴とする異種遺伝子の発現産物の製造方法。

【0056】

(78) 哺乳類型糖鎖が下記構造式(Man5 GlcNAc2)：

【化6】

### 構造式2



によって示される、哺乳類型糖鎖を製造し得るOgataea minutaの作成方法であって、

- 1) Ogataea minutaにおける糖鎖生合成酵素遺伝子であるOCH1及びKTR1遺伝子を破壊する工程、
- 2) Ogataea minutaにおけるプロテアーゼ遺伝子であるPEP4及びPRB1遺伝子を破壊する工程、
- 3)  $\alpha$ -1,2マンノシダーゼ遺伝子をOgataea minutaにおけるアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーターにて発現させる工程、
- 4) 異種遺伝子をOgataea minutaにおけるアルコールオキシダーゼ遺伝子のプロモーターにて発現させる工程、及び
- 5) Ogataea minutaにおけるURA3栄養要求マーカー、Ogataea minutaにおけるADE1の栄養要求マーカー、G418耐性マーカーの群から選ばれるマーカーを含む発現ベクターによってOgataea minutaを形質転換させる工程、を含む、上記方法。

【0057】

(79) 上記(78)に記載の方法によって作製されるOgataea minuta。

(80) 上記(79)に記載のOgataea minutaによって哺乳類型糖鎖を生産する方法。

#### 【0058】

ここでいう「異種遺伝子」とは、発現の対象となる遺伝子であり、Ogataea minuta由来のアルコールオキシダーゼとは異なる任意の遺伝子を意味する。異種遺伝子としては、例えば、酸性フォスファターゼ遺伝子、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子等の各種酵素遺伝子、各種インターフェロン遺伝子、各種インターロイキン遺伝子、エリスロポエチン遺伝子、顆粒球コロニー刺激因子遺伝子等の各種サイトカイン遺伝子、各種抗体遺伝子またはこれらの断片等が挙げられる。また、いかなる手法によって得られるものでもよい。

#### 【0059】

##### 【発明を実施するための形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0060】

本発明における哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の製造法は基本的には下記の工程よりなる。

1) メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株(M8ハイマンノース型糖鎖に $\alpha$ -1,6結合でマンノースが順次結合する伸長反応のキー酵素と考えられるOC H1遺伝子( $\alpha$ -1,6-マンノシルトランスフェラーゼ)破壊株など)にメタノール誘導性プロモーターなどの強力なプロモーターの支配下にて $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを導入・発現させることによって得られる哺乳類型糖鎖を産生するメチロトロフ酵母株を育種する工程。

2) 該糖鎖生合成変異酵母株を用いて、これに目的の糖蛋白質をコードする遺伝子を導入、発現させた酵母株を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を生産する工程。

#### 【0061】

##### 1 哺乳類型糖鎖生産株の作成法

本発明における、酵母特有の外糖鎖生合成系遺伝子を破壊し、更に酵母特有の

糖鎖が除去された哺乳類型糖鎖を生産する酵母変異株は以下のようにして作製することができる。

# 【 0 0 6 2 】

## 1 - 1 Man5型糖鎖（ハイマンノース型糖鎖）生産酵母の作成法

本発明の酵母変異株に必要な変異形質は、酵母特有の外糖鎖生合成系遺伝子の変異であり、具体的には少なくともOCH1遺伝子に変異を有するものである。即ち、上記の変異を有する限り、自然変異株であっても人為変異株であってもよい。

# 【 0 0 6 3 】

OCH1遺伝子とは酵母の外糖鎖形成の初発反応を触媒する $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であり、酵母の糖蛋白質のN型糖鎖のコア糖鎖にさらに $\alpha$ -1, 6結合でマンノースを転移する働きを有し、この反応をきっかけとして動物細胞由来の糖蛋白質に比べて過剰にマンノースが付加し（ハイパーマンノシレーション）、酵母特有のマンナン型糖鎖が形成される。従ってOCH1遺伝子とは厳密に上記活性、機能を有する蛋白質をコードするものであり、単に遺伝子配列または該遺伝子配列より推定されるアミノ酸配列で相同性を有する遺伝子を言うものではない。

しかしながら酵母の糖鎖を哺乳類型糖鎖に変換するためには、このOCH1遺伝子を破壊する操作だけでは十分ではない。

# 【 0 0 6 4 】

前述のように哺乳類細胞では、ハイマンノース型糖鎖に $\alpha$ -マンノシダーゼ I が作用してマンノース数残基を切断し、最終的にMan5ハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) が生成する。このMan5型糖鎖が哺乳類型糖鎖のプロトタイプとなる糖鎖である。この糖鎖にN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT) I が作用し、N-アセチルグルコサミンを1残基転移し、GlcNAcMan5GlcNAc2からなるハイブリッド型糖鎖が生成し、更に順次複合型糖鎖と言われる糖鎖が生成する。よって酵母細胞にて哺乳類型糖鎖を生産させるためには、まずMan5ハイマンノース型糖鎖 (Man5GlcNAc2) を生産する酵母を作出することが前提となる。

本発明に用いられる $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ（別名、 $\alpha$ -マンノシダーゼ-I）は該酵素活性を有するものであれば、特に限定はされない。

## 【 0 0 6 5 】

本発明を効率的に達成するためには $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼの発現部位が大切である。哺乳類細胞では $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼはシス側のゴルジ体の領域で機能すると言われている。一方酵母細胞での酵母特有の糖鎖の付加はシス側、ミディアルまたはトランス側のゴルジ体で行われる。よって酵母特有の糖鎖の付加される過程よりも前、つまりゴルジ体における修飾を受ける前に $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを作用させる必要がある。発現場所が糖蛋白質の輸送経路で下流に存在するゴルジ体では効率的にMan5型糖鎖を生成することはできない。

## 【 0 0 6 6 】

よってこの目的には例えば $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼに酵母における小胞体 (ER) 滞留シグナル (例えばHis-Asp-Glu-Leuで示されるアミノ酸配列) を蛋白質のC末端に付加し、ERに局在させ、活性を発現させることにより、酵母特有の糖鎖の付加を阻害することができる。この方法は本発明者らによって既に報告されている (千葉ら, J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))。

## 【 0 0 6 . 7 】

しかしながらためには、該蛋白質を医薬品として用いるために哺乳類型の糖鎖に変換する場合には、酵母特有の糖鎖をほぼ完全に除去することが必要であり、上記の手法だけでは不十分と考えられる。事実、上記の千葉らの報告においても Saccharomyces cerevisiaeでの検討では、 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子の発現に該株の中で機能する最も強いプロモーターとして知られるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のプロモーターを使用しているが、細胞壁糖蛋白質の糖鎖を解析した結果、Man5型糖鎖の生成は約10%程度しかない。

## 【 0 0 6 8 】

本発明におけるOgataea minutaの糖鎖変異株を用いた系では、以下の実施例に示すように、酵母の細胞壁糖蛋白質の糖鎖の80%以上がMan5型糖鎖になっており、かつ異種の遺伝子の分泌発現例においても、80%以上がMan5型糖鎖になっている。よってSaccharomyces cerevisiaeでの問題点が解決されている。この結果より、本発明のOgataea minutaの様々な糖蛋白質への応用が期待される。

## 【 0 0 6 9 】



一方、千葉らはコア糖鎖であるMan8型糖鎖しか生成しない $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 株を利用している。MNN1遺伝子はSaccharomyces cerevisiaeに特有の遺伝子と推定されており、また糖鎖合成経路、及び糖鎖合成遺伝子が単離、解析されているが、他の酵母では糖鎖構造について十分に解析されていない。例えばPichia pastorisでは前述のように $\beta$ マンノシド結合を有する糖鎖の存在が知られている（Higgins編、Pichia Protocols, 1998, p95-105, Humana Press、及びBiochim. et Biophys. Acta, 1426 1999, 227-237）。また特開平9-3097に開示されたOCH1遺伝子ホモログ破壊株が産生する糖蛋白質のSDS-PAGEの結果から見て、確かに糖鎖は低分子化されているデータを提示しているが、Man8型糖鎖のような単一の糖鎖を有する糖蛋白質でないことが推定される。これらの糖鎖合成に関与する遺伝子は単離されておらず、よって遺伝子の単離、破壊には多大な労力を必要とする。

## 【0070】

よって酵母株においてMan5型糖鎖を生産させるためには $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを高発現させる必要があり、この目的には強力なプロモーターが必要となる。そこで本発明では、最強の誘導性高発現プロモーターとして知られるメチロトロフ酵母由来の（メタノール誘導性）アルコールオキシダーゼ（AOX）遺伝子プロモーターを利用することにより発明を完成した。本発明に用いられる誘導性発現プロモーターとしては、その他ジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）遺伝子、ギ酸脱水素酵素（FDH）遺伝子のプロモーターも利用できるが、本発明のメチロトロフ酵母において発現し得るメタノール誘導性プロモーターであればいずれでも良く、特に限定するものではない。

## 【0071】

よって、ER及びゴルジ体内で酵母特有の糖鎖が付加される糖鎖上の付加部位を予めトリミング（除去）することにより、酵母特有の外糖鎖生合成遺伝子を破壊することなく、哺乳類型糖鎖を生産することができ、 $\beta$ マンノシド結合を形成する遺伝子、リン酸マンノースを付加するMNN4遺伝子などの取得が不要になる。

## 【0072】

しかしながらOCH1については酵母でかなり普遍的に存在し、コア糖鎖の比較的還元末端側に存在するため、活性を除去するために遺伝子を破壊する必要がある。

ると考えられる。

#### 【0073】

本発明に応用される酵母株としては、糖蛋白質の糖鎖が主に $\alpha$ -1,2マンノシド結合にて構成される株であれば、いかなる酵母株でもよく、本発明の対象となるメチロトロフ酵母としては、主に $\alpha$ -1,2マンノシド結合よりなるN-型糖鎖を有する糖蛋白質を産生する酵母であれば特に制限はないが、具体的にはOgataea minuta, Candida succiphila, Pichia pastoris, Pichia trehalophila, Pichia methanolica, Pichia angusta, Hansenula polymorpha等が例示される。好ましくはOgataea minutaである。

#### 【0074】

よって本発明で開示された手法はコア糖鎖にOCH1遺伝子によって付加される $\alpha$ -1,6マンノース以外の糖鎖が直接に付加された構造を有する酵母株には適用できない。つまりコア糖鎖部分、厳密にはMan5型糖鎖部分に酵母特有の糖鎖が付加された糖蛋白質を生成する酵母株は本発明の手法を利用できない。

#### 【0075】

更に $\alpha$ -マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーであるKTR遺伝子群ホモログ、またはゴルジ体での糖鎖付加に関与していると言われているMNN9遺伝子ホモログを補助的に破壊することにより、より効率的に哺乳類型化を達成することができよう。

#### 【0076】

また更に糖鎖変異株は一般的に糖蛋白質中の糖鎖が小さくなり、結果として細胞壁が弱くなるため糖鎖変異株は薬剤感受性が上昇したり、浸透圧に対する耐性が低下したりする。その結果、細胞の培養に課題を残す場合が考えられるが、本発明におけるメタノール誘導性プロモーターを利用し $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを発現させる手法では副生的に目的の蛋白の生産と同時に哺乳類型糖鎖の生産もできるため、酵母細胞の増殖時に負担をかけることなく、培養・生産を行うことができる。

#### 【0077】

### 1-2 ハイブリッド型、及び複合型糖鎖生産酵母の作成法

以上のようにして作製された変異株は、Man5型のハイマンノース型の哺乳類型糖鎖を生産することができるが、さらにハイブリッド型、複合型の糖鎖哺乳類型糖鎖を生産させるためには、該変異株に糖鎖加水分解酵素遺伝子群、および糖転移酵素遺伝子群を導入することにより達成される。また本来糖鎖の生合成は前述のようにER、ゴルジ体内で行われるので、糖鎖の原料となる糖ヌクレオチドがこれらの器官に存在することが必要であるが、酵母内ではこれらの糖ヌクレオチド輸送体はないか、有っても実際に糖鎖が生合成される器官には微量しか存在しないと考えられる。従って、細胞質内で生合成された糖ヌクレオチドを細胞質からER、ゴルジ体内へ移動させる糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群も更に必要であろう。上記の糖鎖加水分解酵素遺伝子群、糖転移酵素遺伝子群、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群に属する遺伝子を「哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子」という。

## 【0078】

糖鎖加水分解酵素遺伝子群としては、 $\alpha$ -マンノシダーゼ ( $\alpha$ -マンノシダーゼ II) 等の遺伝子、糖転移酵素遺伝子群としては、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (GnT-I, GnT-II, GnT-III, GnT-IV, GnT-V)、ガラクトシルトランスフェラーゼ (GalT)、フコシルトランスフェラーゼ (FucT) 等の遺伝子、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子群としては、UDP-GlcNAc Transporter, UDP-Gal Transporter 等の遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は哺乳類由来の遺伝子を単離して利用することもできるし、また遺伝子を合成して利用することによっても可能である。

## 【0079】

上記の「哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子」は、上記の1種または2種以上の遺伝子群に属する遺伝子を、目的とする糖鎖を生産するのに必要な数だけ導入する。導入する遺伝子が複数の場合は、それらの遺伝子が同種の遺伝子群に属していても、互いに異種の遺伝子群に属していてもよい。

## 【0080】

生成する糖鎖、及び糖蛋白質を高収率で得るためには、上記酵素を適切な器官（例えばゴルジ体）にて高発現させることが望ましい。よって酵母のコドン使用頻度に合わせた遺伝子を用いることは有効である。また酵素を適切な器官に局在

させるためには、酵母のシグナル配列等を付加することも有効である。遺伝子の導入については染色体組み込み型タイプ (YIpタイプ) 等ベクターを用いる方法が考えられる。遺伝子を発現させるために必要なプロモーターはGAPDH, PGK等の構成的発現プロモーター、AOX1等の誘導発現プロモーターなど特に限定されない。しかし糖鎖加水分解酵素、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体遺伝子を1種または複数発現させた場合には酵母の増殖に影響を及ぼすことがあるので、その場合には誘導プロモーターの使用や、遺伝子を導入する順序を考慮する必要がある。

#### 【0081】

上記の哺乳類型糖鎖を生産する酵母変異株、あるいは、該変異株に上記の外来遺伝子群を導入した変異株を、培地に培養すれば、酵母特有の外糖鎖の含量が低下し、哺乳類細胞の生産するハイマンノース型糖鎖 ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ )、混成型糖鎖 ( $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ )、複合型糖鎖 ( $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 等) と同一のAsn結合型糖鎖を含有する糖蛋白質を、酵母細胞内または細胞外に生産させることができる。

#### 【0082】

具体的には、該変異株にGnT-I遺伝子を導入することにより、混成型糖鎖を生産させることができ、また、哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子 ( $\alpha$ -マンノシダーゼ II、GnT-II、GalT、UDP-GlcNAc Transporter, UDP-Gal Transporter遺伝子) を導入することにより、二本鎖複合型糖鎖 ( $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$ ) を生産させることができる。

#### 【0083】

### 2 本発明におけるOgataea minutaの各種遺伝子

本発明の蛋白質はそれぞれその活性を有するものであれば特に制限されないが、実質的に下記実施例に記載の配列番号にて示されるアミノ酸配列を有する蛋白質である。本明細書において「実質的に配列番号〇〇で示されるアミノ酸配列」とは、

(a) 配列番号〇〇で示されるアミノ酸配列、及び

(b) 配列番号〇〇で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸

が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含むことを意味する。すなわち、該アミノ酸配列は、上述の特性を変更しない範囲で、一部が修飾（例えば、アミノ酸残基またはペプチド鎖の置換、欠失、挿入または付加等）されていてもよい。ここで、アミノ酸の欠失、置換若しくは付加の数としての数個とは、当分野において通常用いられる方法によって導入できる範囲であり、好ましくは2～10個、より好ましくは2～5個、更に好ましくは2～3個である。

【0084】

本発明の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAは、前述の本発明のOgat aea minutaに由来する蛋白質をコードする塩基配列を有することを特徴とするものである。かかる塩基配列は、本発明の蛋白質をコードし得る塩基配列であれば特に制限されないが、実質的に下記実施例に記載の配列番号で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列が例示される。本明細書において「実質的に配列番号〇〇で示される塩基配列」とは、

(a) 配列番号〇〇で示される塩基配列、及び

(b) 配列番号〇〇で示される塩基配列において1若しくは数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加された塩基配列

を含むことを意味する。該DNAは、従来公知の手法により製造することができる。例えば、本発明で例示する塩基配列をもとにDNA合成機を用いてその一部または全てのDNAを合成したり、染色体DNAを用いてPCR法で増幅させることにより製造することも可能である。ここで、ヌクレオチドの欠失、置換若しくは付加の数としての数個とは、例えば当分野において通常用いられる部位特異的突然変異誘発導入法（例えばMolecular Cloning, A Laboratory manual, 第二版, Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997))を用いて導入できる範囲を意味し、例えば2～10個、好ましくは2～5個、より好ましくは2～3個を意味する。

【0085】

3 遺伝子取得法

標的遺伝子断片の単離は、一般的手法 (Molecular Cloning(1989), Methods in Enzymology 194(1991)) にしたがって酵母株よりからゲノムDNAを抽出し、目的遺伝子を選別することにより可能である。上記において、*Ogataea minuta*からのゲノムDNAの抽出は、例えば、Cryer らの方法 (Methods in Cell Biology, 12, 39-44 (1975)) およびP. Philippsenらの方法 (Methods Enzymol., 194, 169-182 (1991)) に従って行なうことができる。

## 【 0 0 8 6 】

例えば酵母のプロトプラストを調製して、当該プロトプラストから、通常公知のDNA抽出法、高塩濃度下での細胞残さ除去後のアルコール沈殿法、フェノールやクロロホルム抽出後のアルコール沈殿法等の常法を用いて行なうことが出来る。なお、上記の予めプロトプラストを調製する方法の他に、ガラスビーズ等による細胞破碎法等によってもDNAの抽出を行なうことが出来るが、高分子量のDNAを調製することが容易であるという点から上記プロトプラスト法を行なうのが好ましい。

## 【 0 0 8 7 】

標的遺伝子の取得は、例えばPCR法 (PCR Technology, Henry A. Erlich, A stockton press(1989)) によって行なうことができる。PCR法は、インビトロ (*in vitro*) でDNAの特定断片をその領域の両端のセンス・アンチセンスプライマー、耐熱性DNAポリメラーゼ、DNA増幅システム等の組み合わせを用いて約2～3時間で数十万倍以上に増幅できる技術であるが、標的遺伝子の増幅には、プライマーとして25～30merの合成1本鎖DNAを、鋳型としてゲノムDNAを用いる。増幅された遺伝子は塩基配列を確認することにより、用いることができる。

## 【 0 0 8 8 】

遺伝子のDNA配列の決定等は通常の方法、例えばジデオキシ法 (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977)) 等により行なうことができる。更に上記DNA塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いることによっても容易に行ない得る。

## 【 0 0 8 9 】

DNAの単離・精製等は何れも常法、例えば大腸菌の場合、アルカリ/SDS法とエ

タノール沈殿によるDNA抽出、更にRNase処理、PEG沈殿法などによりDNAを精製できる。

#### 【0090】

また標的遺伝子の取得は、(a)上記酵母の全DNAを抽出し、当該DNAに由来するDNA断片を組み込んだ遺伝子導入用ベクターを宿主に導入して上記酵母の遺伝子ライブラリーを作製し、(b)ついで、かかる遺伝子ライブラリーから所望のクローンを選択して、当該クローンを増幅する、ことによっても実施することが出来る。

#### 【0091】

遺伝子ライブラリーの調製は、上記の方法にて得られた染色体DNAを適当な制限酵素 (Sau3AI等) によって部分消化して断片化し、適当なベクターに連結した後、適当な宿主に形質転換することによってゲノミックライブラリーを得ることが出来る。またはまず上記のPCR法により標的遺伝子の断片を取得し、ゲノムサザン解析により標的遺伝子を効率よく取得できるような制限酵素部位を探索し、該制限酵素によって染色体DNAを消化して断片を得ることによっても可能である。この際用いられるベクターとしては、通常公知の遺伝子ライブラリー調製用ベクターとして知られる、pBR系統、pUC系統、ブルースクリプト (Bluescript) 系統等の一般に市販されている入手可能なプラスミドを用いることも出来る。また、Charon系統やEMBL系統のファージベクター又はコスミド等も広く用いることが出来る。調製した遺伝子ライブラリー作製用ベクターで形質転換又は形質導入を行なう宿主は、上記ベクターの種類に応じたものを採用することが出来る。

#### 【0092】

クローンの選択は、上記遺伝子ライブラリーから、標的遺伝子に特有の配列を含む標識プローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法等により選択し、得ることが出来る。プローブに用いる標的遺伝子に特有の配列は、Ogataea minutaから精製した標的蛋白をコードする遺伝子のアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、Ogataea minutaの染色体DNAを鋳型とするPCRにより所望するDNA断片を特異的に増幅し、得ることが出来る。また他種の同種蛋白をコードする遺伝子をGenBankなどのDNAデータ

ベース、SWISS-PROTなどの蛋白データベースより検索し、配列を入手し、BLAST等のホモロジー検索プログラム、GENETYX（ソフトウェア開発）、DNAsis（日立ソフトウェア）などの解析ソフトにて、保存されているアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、Ogataea minutaの染色体DNAを鋳型とするPCRによりDNA断片を特異的に増幅し、得ることが出来る。なお合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてもよい。塩基配列が一旦決定されると、その後は、化学合成によって、又は決定された当該塩基配列から合成したプライマーを用いたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、所望の遺伝子を得ることが出来る。

【0093】

#### 4 遺伝子破壊法

本発明において、標的遺伝子の破壊は、Rothstein, Methods Enzymol., 101, 202-211 (1983)に開示される方法に基本的に従って行い得る。具体的には、上記の方法にて得られた標的遺伝子DNAを分断あるいは部分欠失させ、そこに適当な選択マーカー遺伝子DNAを挿入して標的遺伝子の上流部と下流部の間に選択マーカーがサンドイッチされたDNA構造体を作製し、次にこの構造体を酵母細胞に導入することによって達成される。以上の操作により、導入断片（選択マーカーを挟み込んだDNA構造体）の両端と染色体上の標的遺伝子との相同部分の間で2回の組み換えを起こし、染色体上の標的遺伝子が導入断片で置換される。ここでの遺伝子破壊に用いる選択マーカーは下記に示すような栄養要求性マーカーや薬剤耐性マーカーが用いられる。この場合1つの遺伝子を破壊するために一般的には1つの選択マーカーを要することになるが、URA3遺伝子を利用した場合、ura3形質を効率的に再生することができるので、本目的にしばしば利用される。

【0094】

具体的に、OCH1遺伝子破壊株の作製を例にとり説明する。構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子を有するプラスミドを構築し、この遺伝子カセットを制限酵素で切りだし、プラスミド上の標的遺伝子に挿入し、破壊された対立遺伝子を構築する。このプラスミドを用いて染色体の標的遺伝子と置換して遺伝子破壊株を得る。染色体に挿入されたURA3遺伝子は前後に反復構造を有するため、



反復配列間での相同的組み換えによりURA3遺伝子が染色体から脱落する。この脱落株の選択は5-フルオロオロト酸 (5-FOA) により行なうことができる。ura3変異株は5-FOAに耐性であり (Boeke et al., Mol. Gen. Genet., 197, 345-346 (1984); Boeke et al., Methods Enzymol., 154, 165-174 (1987))、URA3+表現形を持つ細胞株は5-FOA培地に生育できなくなる。よって、5-FOAを加えた培地で耐性形質を持つ株を分離すれば、再びURA3遺伝子マーカーを用いての操作が可能である。従って、該手法により人為的に遺伝子破壊を行った「人為破壊株」では、元の酵母株の有する栄養要求性変異形質が遺伝子破壊操作により損なわれない。

尚、上記の手法によらず遺伝子破壊が自然に起こっている「自然変異株」では、上記の手法を用いることはないので、栄養要求性変異形質の数は増減しない。

【0095】

#### 5 遺伝子を導入するためのマーカー

また、本発明の酵母変異株における外来遺伝子を導入するための栄養要求性マーカーは、使用する酵母株に規定されるものであり、具体的にはura3変異, his3変異, leu2変異, ade2変異, trp1変異から選ばれる。栄養要求性マーカーの数は導入する遺伝子の数によるが、一般的に、1つの遺伝子を導入するのに1個の栄養要求性マーカーが必要である。複数の遺伝子を導入する場合は、導入する遺伝子断片が長く、導入効率が低下し、ひいては発現効率も低下するので、導入遺伝子の数が多いほど多数の栄養要求性マーカーが必要となる。

【0096】

本発明において、栄養要求性を相補する遺伝子とは、アミノ酸、核酸等の生体成分の合成系の遺伝子である。変異形質はこれらの遺伝子が機能しないような変異が入っているものなので、相補する遺伝子は元の機能する遺伝子そのものである。よって、元の酵母株由来の遺伝子が望ましい。

【0097】

なお選択マーカーとしては、上記の栄養要求性マーカーのみならず、G418、セルレニン、オーレオバシジン、ゼオシン、カナバニン、シクロヘキシミド、ハイグロマイシン、ブラストシジン等の薬剤に対し、耐性を付与する薬剤耐性マーカーなどを使用することで、遺伝子の導入や破壊を行うことも可能である。また、

エタノール等に対する溶剤耐性や、グリセロールや塩等に対する浸透圧耐性、銅等の金属イオン耐性等を付与する遺伝子をマーカーにすることで、遺伝子の導入や破壊を行うことも可能である。

【0098】

#### 6 DNAの細胞への導入および形質転換の方法

上記操作における、DNAの細胞への導入およびこれによる形質転換の方法としては、一般的な方法、例えばリチウム塩で処理して自然にDNAを取込みやすい状態にしてプラスミドを取り込ませる方法 (Ito et al., Agric.Biol.Chem., 48, 341 (1984)) や、あるいは電氣的にDNAを細胞内に導入する方法、プロトプラスト法 (Creggh et al., Mol.Cell.Biol., 5, 3376 (1985))、等を採用できる (Becker and Guarente, Methods Enzymol., 194, 182-187 (1991))。本発明の発現ベクターは宿主染色体DNAに組み込まれ、安定に存在させることが出来る。

【0099】

#### 7 異種遺伝子の発現

ここでいう「異種遺伝子」とは、発現の対象となる遺伝子であり、*Ogataea minuta*由来のアルコールオキシダーゼ、またはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素とは異なる任意の遺伝子を意味する。異種遺伝子としては、例えば、酸性フォスファターゼ遺伝子、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子等の各種酵素遺伝子、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\gamma$ 等の各種インターフェロン遺伝子、IL1, IL2等の各種インターロイキン遺伝子、エリスロポエチン (EPO) 遺伝子、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 遺伝子等の各種サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子、各種抗体遺伝子等が挙げられる。これらの遺伝子はいかなる手法によって得られるものでもよい。

【0100】

本発明を効率的に利用するためには哺乳動物細胞、特にヒトに由来する細胞が産生する糖蛋白質をコードする遺伝子が用いられる。つまり本発明の目的は哺乳類、特にヒトと同一または類似の糖鎖構造を有する糖蛋白質を生産することであるため、蛋白質分子上に糖鎖構造を有する糖蛋白質に対して有効である、更に医薬上有用な生理活性蛋白質に対して適用される。その中には抗体も含まれる。抗

体は古くから医薬品としての利用がなされてきたが、ヒト以外の他起源由来のものであったため、投与された抗体自身に対する抗体が産生され、複数回の投与ができず、その利用が制限されてきた。近年、抗原結合部位以外のアミノ酸配列をヒト抗体由来の配列に置換したヒト型抗体が作成されるようになり、更にマウスにヒト抗体遺伝子を導入したヒト抗体生産マウスが作出され、完全ヒト抗体が利用されるになり、抗体の医薬品としての利用が急速に広まってきた。現在これらの抗体はハイブリドーマや抗体をコードする遺伝子が導入されたCHO細胞などの培養細胞に導入し生産されているが、生産性、安全性などの点で問題が多い。よってこれらの問題を克服できる酵母での生産が期待されている。しかしながら抗体分子には少なくともN型糖鎖が2ヶ所、各々の重鎖に付加された糖蛋白質であり、酵母で抗体を生産した場合、酵母特有の糖鎖が付加されてくる。この糖鎖自体、前述のように抗原性を有したり、生理活性を低下させる作用を有する。よって酵母で生産される抗体を医薬品として利用する場合には該糖鎖の哺乳類型化は避けては通れない。

## 【0101】

一方、糖鎖の還元末端側のGlcNAcに付加される $\alpha$ -1,6フコースの除去によりADCC活性の高い抗体の作成法が報告されている(PCT/JP00/02260)。この $\alpha$ -1,6フコースの付加に関わる遺伝子として $\alpha$ -1,6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子(FUT8)が知られているが、該遺伝子は動物細胞に普遍的に存在し、本酵素活性を欠落した細胞、または人為的に該遺伝子を破壊した細胞を用いない限り、作成した抗体の一部の分子については必ず $\alpha$ -1,6フコースが付加されている。

しかしながら酵母には一般的にはフコースの合成系はなく、 $\alpha$ -1,6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子(FUT8)も存在していないので、人為的な遺伝子破壊なしに $\alpha$ -1,6フコースのない糖蛋白質を生産することができる。よって自ら高活性の抗体が生産できるであろう。

## 【0102】

酵母でのFab、ScFvなどの抗体断片の高生産については報告があるが、完全長の抗体の高生産についての報告はほとんどない。Fab、ScFvなどの抗体断片は抗体重鎖に存在するFc領域を有していないため、抗体特有の生理活性である抗体

依存性細胞障害活性 (ADCC)、補体依存性細胞障害活性 (CDC) を有さず、医薬品としての利用が制限されている。抗体は計 14 箇所のジスルフィド (S-S) 結合を有しており、酵母細胞内で抗体全長が高生産できないのは分子が適切にホルディングできないためと考えられる。この原因は明らかではないが、抗体重鎖に付加されている N 型糖鎖の構造の違いに起因している可能性は否定できない。よって本発明の哺乳類型糖鎖生産酵母を利用することにより、効率的に適切な立体構造を有する抗体分子を生産できる可能性がある。また Sec63、BiP/KAR2、Protein Disulfide Isomerase の分子シャペロンの導入により機能的な抗体を高生産することができるであろう。尚、本発明においては、完全な抗体分子を生産することも可能であるが、上記した抗体断片あるいは目的の機能を有する限りにおいて他の抗体断片を生産することも可能である。また、抗体としては、特に限定するものではないが、哺乳類型、特に好ましくはヒトの抗体の枠組みに他の哺乳類の抗体の抗原結合部位を導入したヒト化抗体またはヒト抗体が挙げられる。

## 【0103】

また異種タンパク質を遺伝子組み換え法によって生産する場合、目的産物が宿主由来のプロテアーゼによって分解されることがある。そのような場合、目的タンパク質の生産量が減少し、また不均一な目的タンパク質が生成し、かつタンパク質分解産物の混入により目的タンパク質の精製が困難となる。

## 【0104】

このような問題を回避するために、組換え体を培養する培地の pH を調整することによりプロテアーゼ作用を阻害する等の、目的タンパク質を分解するプロテアーゼ活性を阻害するような培養方法が検討されている。しかしながらこの方法はある種の異種タンパク質を発現する宿主酵母の増殖に影響を与えるであろうし、細胞外でのタンパク質の分解にのみ効果的である。

## 【0105】

Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris、Candida boidinii においてプロテイナーゼ A、プロテイナーゼ B を不活性化した株をプロテアーゼ欠損株として用いることにより、菌体内及び菌体外タンパク質生産を増加させたという例が示されている (特表平 6-506117、Weis, H.M. ら、FEBS Lett., 377, 451 (1995), Ino

ue, K. ら、Plant Cell Physiol. , 38(3), 366(1997)、特開2000-78978)。

【0106】

プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは液胞に局在するプロテアーゼで、それぞれPEP4遺伝子、PRB1遺伝子によってコードされている。酵母Saccharomyces cerevisiaeの研究によれば、プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBは自分自身やカルボキシペプチダーゼYなどの別のプロテアーゼを活性化する (vandenHazel, H. B. ら、YEAST, 12, 1(1996))。

【0107】

本発明によるプロテアーゼ活性の低下したPEP4遺伝子欠失Ogataea minuta株とPEP4PRB1遺伝子欠失Ogataea minuta株は、栄養培地を用いた培養条件下で野生株と同等の増殖能力を保持しており、異種タンパク質生産のための優れた宿主である。よって当該酵母はプロテアーゼ感受性の高い抗体などの異種タンパク質を効率的に生産することができる。

【0108】

## 8 異種遺伝子の発現カセットの構築

蛋白質生産のための有用な発現系は、種々の方法により作製することができる。

蛋白質発現ベクターは、転写の読み枠の方向に、少なくともプロモーター領域、蛋白質をコードするDNA及び転写ターミネーター領域を有するものである。これらのDNAは、所望の糖蛋白質をコードするDNAがRNAに転写されるように、お互いに機能するように関連して配列される。

【0109】

本発明において使用し得る高発現プロモーターは、好ましくはメタノール誘導発現プロモーターであり、例えばOgataea minuta のアルコールオキシダーゼ(AOX)遺伝子プロモーター、Ogataea minuta のジヒドロキシアセトン シンターゼ(DAS)遺伝子プロモーター、Ogataea minuta のギ酸脱水素酵素(FDH) 遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

【0110】

構成発現プロモーターとしては、Ogataea minuta のグリセルアルデヒド-3-

リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子プロモーター、Ogataea minuta のホスホグリセロキナーゼ (PGK) 遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

#### 【0111】

また転写ターミネーターは、プロモーターからの転写に対して転写終結を起こす活性を有する配列であればよく、プロモーターの遺伝子と同じもしくは異なるものであってもよい。

#### 【0112】

本発明の一態様として、本発明者等は、(1)メタノール誘導発現カセットしてOgataea minutaが有するアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子、構成的発現カセットしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子の塩基配列をそのプロモーター、ターミネーターと共に取得し、(2)プロモーター、ターミネーターを単離し、(3)発現ベクターを構築し、さらに(4)本発現ベクターを用いて形質転換細胞を作製し、異種遺伝子を発現させた時、Ogataea minuta由来の遺伝子と同様にその発現がなされることを確認した。具体例としてアルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子由来のプロモーター、ターミネーターを用いる異種遺伝子の発現カセットについて以下に述べる。

#### 【0113】

##### 8-1 アルコールオキシダーゼ (AOX) 遺伝子クローニング

本発明の発現カセットを取得するため、まずアルコールオキシダーゼ遺伝子のクローニングを行う。その出発材料としては、酵母、例えばOgataea minuta IF0 10746株が例示される。遺伝子クローニング方法は上記に示した方法にて行うことができる。

#### 【0114】

##### 8-2 プロモーター領域、ターミネーター領域の単離

プロモーター領域、ターミネーター領域を取り出すには、制限酵素を用いて切り出すことも可能でもあるが、一般的に都合の良い制限酵素部位が適切な位置に存在するとは限らない。そこで、コーディング領域の制限酵素部位からエンド型 DNA 分解酵素によってプロモーターの方向に削って行き、適当なところまで削れたクローンを探す方法もある。最近では予め制限酵素認識部位を末端に設けたプ

ライマーを用い、PCR で所望のプロモーター領域、ターミネーター領域を増幅し取得することが容易である。

#### 【0115】

また、これらの領域を化学合成することも可能であるし、一部の領域を化学合成しクローン化したDNAと制限酵素部位を利用して半合成のプロモーターやターミネーターを作製することも可能である。

#### 【0116】

配列番号79にプロモーター領域を含む配列、配列番号80にターミネーター領域を含む配列を例示するが、本質的に転写活性を保持する配列であればこの配列に限定されるものではなく、欠失、挿入、置換、付加などによってその塩基配列を改変することが可能である。

#### 【0117】

なお、塩基配列の改変は、公知の突然変異導入法（例えば宝酒造社のTAKARA LA PCR in vitro Mutagenesis kitを用いた方法）等により行うことが出来る。またプロモーター領域を広範囲に欠失させる場合は、例えば、市販のデレーション用キット（宝酒造社のキロシーケンス用デレーションキット）を用いて、PCRにより調製するのが適当である。

#### 【0118】

### 8-3 発現ベクターの構築

本発明の発現ベクターは、AOXプロモーター、異種構造遺伝子、AOXターミネーター、マーカー遺伝子、相同領域を適当なベクターに挿入することによって得られる。そのため使用されるベクターとしては、特に限定するものではないが、前記pBR系統、pUC系統、ブルースクリプト系統等の大腸菌プラスミドベクターが例示される。発現ベクターの構成成分をベクターに挿入することは、後記実施例の記載を参照して、あるいは慣用の技術により当業者が容易に実施することが可能である。選択マーカー遺伝子、相同領域は当業者が容易に決めることが出来る。マーカー遺伝子として、上述のG-418、ハイグロマイシン等の抗生物質耐性遺伝子、URA3、ADE1等の栄養要求性相補遺伝子が例示される。

#### 【0119】

また異種構造遺伝子に酵母細胞で機能する分泌シグナル配列をコードするDNAを付加してもよく、この発現系によれば、糖蛋白質が宿主細胞外に分泌産生されるため、所望の糖蛋白質を容易に単離精製することができる。分泌シグナル配列としては、Saccharomyces cerevisiae 由来 $\alpha$ -接合因子( $\alpha$ MF)の分泌シグナル配列、Saccharomyces cerevisiae 由来インベルターゼ(SUC2)の分泌シグナル配列、ヒト由来 $\alpha$ -ガラクトシダーゼの分泌シグナル配列、ヒト由来抗体軽鎖の分泌シグナル配列、などが挙げられる。

## 【0120】

作成された発現ベクターは染色体組み込み型のベクターであり、染色体へ組み込むことによって目的の遺伝子が導入される。栄養要求マーカー型のベクターの場合は、該マーカー遺伝子部分を制限酵素により切断し一本鎖にし、形質転換を行い、一般的には染色体上の対立遺伝子の部分に導入される。また薬剤耐性マーカーの場合、対立遺伝子が存在しないため、発現プロモーターまたはターミネーター領域を制限酵素により切断し一本鎖にし、形質転換を行い、一般的には染色体上の該領域の部分に導入される。一旦導入された遺伝子は染色体上に存在するので、安定的に保持される。

## 【0121】

## 8-4 発現ベクターの利用

本発明のAOXプロモーターを利用した発現ベクターは $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子、及び目的とする異種遺伝子の発現に有効だけでなく、その他の遺伝子の発現にも有効である。別種の選択マーカーを結合した発現ベクターを用いることにより、何度も導入することができ、複数の遺伝子の高発現が達成できる。

## 【0122】

例えば、酵母はカビ等と比較して本来分泌蛋白質を多く生成する宿主ではない。よって分泌機構が充実していないことが予想される。事実、上述のように本来酵母における抗体の生産性は低い。

よって分泌効率を向上させるために分子シャペロンなどを導入し、高発現する場合にも有効である。

## 【0123】



## 9 哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の生産

上記の糖鎖を持つ異種生物由来の糖蛋白質を生産させるためには、上記酵母変異株を宿主として、目的の糖蛋白質をコードする遺伝子（cDNAなど）を上述の酵母で発現出来るプロモーターの下流に接続した遺伝子を作製し、相同組換えによって上記酵母宿主に組み込むか、或いは、プラスミドに挿入して上記宿主を形質転換することにより、上記宿主の形質転換体を作製し、これを公知の方法により培養することにより、酵母細胞内または細胞外に生産された目的の糖蛋白質を回収し、精製することにより得られる。

### 【0124】

上記哺乳類型糖鎖生産酵母変異株は野生酵母株とほぼ同等の増殖能力を保持しており、該酵母変異株の培養は、酵母の培養に慣用される常法に従って行なうことができる。例えば、Difco社から供給される各種の培地成分を添加し、かつプラスミドの複製・保持に必要なマーカーによって供給可能となるアミノ酸を除いた合成培地（炭素源、窒素源、無機塩類、アミノ酸、ビタミン等を含む）等を利用できる（Sherman, Methods Enzymol., 194, 3-57 (1991)）。

### 【0125】

メタノール誘導性プロモーターを用いた発現ベクターにより異種遺伝子を発現、目的の遺伝子発現産物を生産するための培養培地には、酸素原子又は窒素原子を有し、かつ該原子に結合する炭素数1の置換基を少なくとも1つ有する化合物を含むものを添加することが出来る。例えば、酸素原子を有する化合物としてメタノールを添加することができ、窒素原子を有する化合物としてメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、及びN-置換メチルを有するアンモニウム化合物（例えばコリン等）からなる群から選ばれる少なくとも一種を添加することが出来る。

### 【0126】

例えば炭素源としてメタノールを含む他、酵母エキス、トリプトン、肉エキス、カザミノ酸、アンモニウム塩等の一種以上の窒素源に、リン酸、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、銅、マンガン、コバルト等の無機塩類を添加し、更に必要により各種ビタミン、ヌクレオチド等の微量栄養素、誘導

前の細胞増殖のために糖質原料を便宜添加したものが挙げられる。具体的にはYPM培地（0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ペプトン、0.5%メタノール）、BYPM培地（0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ペプトン、0.5%メタノール、0.1Mリン酸緩衝液pH6.0）、BM培地（0.67%酵母ニトロゲンベース、0.5%メタノール、0.1Mリン酸緩衝液pH6.0）等が挙げられる。

## 【0127】

一方構成的発現プロモーターを用いた発現ベクターにより異種遺伝子を発現、目的の遺伝子発現産物を生産するための培養培地には、細胞増殖に適した培地を用いればよく、例えばYPD培地（1%イーストエキストラクト、2%ペプトン、2%グルコース）等の天然培地、SD培地（0.67%酵母ニトロゲンベース、2%グルコース）等の合成培地が用いられる。栄養要求マーカーを有する酵母株については、相補する栄養素を上記培地に加えればよい。

## 【0128】

培地のpHは、5.5～6.5に調整するのが適当である。また、培養温度は15～30℃、好ましくは28℃前後である。抗体のように立体構造が複雑な蛋白質な場合、細胞内でそのフォールディングをより効率的に行うために、低温で培養することが好ましい。培養時間は、24～1000時間程度であり、培養は静置、振とう、攪拌、通気下の回分培養または連続培養等により実施することが出来る。

上記の培養物（培養液、培養菌体）から目的の遺伝子発現産物を単離精製するためには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

## 【0129】

例えば、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。又、培養上清に生産された場合は、培養液そのものを用いることが出来る。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。目的の遺伝子発現産物の分解を抑制するためにプロテアーゼ欠損株を用いることが、有効である。該無細胞抽出液または上清を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法により精製標品を得ることが出来る。即ち、プロタミン処理等による核酸の除去、硫酸、アルコール、アセトン等

を添加して分画する、沈殿法、DEAEセファロース、Qセファロース等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-セファロースFF（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、His Bindレジン（Novagen社製）などのキレートカラム、ProteinAセファロース、Blueセファロースなどの群特異的吸着色素を結合したレジン、ConAセファロースなどのレクチンカラムなどを用いたアフィニティークロマトグラフィー法、逆相クロマトグラフィークロマトフォーカシング法、等電点電気泳動、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。しかし、上記培養法、精製法は一例であって、これに限定されるものではない。

#### 【0130】

なお、精製された遺伝子産物が有するアミノ酸配列の確認は、公知のアミノ酸分析、例えばエドマン分解法による自動アミノ酸配列決定法等により行うことができる。

#### 【0131】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、これらの実施例は本発明の技術的範囲を何等限定するものではない。本発明の実施例で用いるプラスミド、制限酵素等の酵素、T4DNAリガーゼ及び他の物質は市販のものであり、常法に従って使用することができる。DNAのクローニング、塩基配列の決定、宿主細胞の形質転換、形質転換細胞の培養、得られる培養物からの酵素の採取、精製等に用いられた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

#### 【0132】

なお、各種遺伝子の制限酵素地図における制限酵素サイトについては以下の略号で示してある。Ac; AccI, Ap; ApaI, B1; BalI, Bm; BamHI, Bg; BglII, Cl; ClaI, RI; EcoRI, RV; EcoRV, TI; EcoT22I, Hc; HincII, Hd; HindIII, Kp; KpnI, Nd; NdeI, Nh; NheI, Nt; NotI, Ps; PstI, Sc; SacI, Sl; SalI, Sm; SmaI

、Sp; SpeI、Sh; SphI、St; StyI、Xb; XbaI、およびXh; XhoIである。

### 【0133】

#### 〔実施例1〕 哺乳類型糖鎖生産に適したメチロトロフ酵母の選択

メチロトロフ酵母を用いて哺乳類型糖鎖生産酵母を育種するためには、メチロトロフ酵母特有の糖鎖合成遺伝子をクローニング、不活化する必要がある。上述のように酵母の糖鎖構造はその種類により大きく異なる。つまり糖鎖生合成に関与する酵素、遺伝子も異なってくる。よって酵母特有の糖鎖を除去するために関与する遺伝子を破壊する場合、第一に遺伝子の単離を行う必要があるが、非常に多くのステップを踏む必要がある。そこで、そのようなステップができるだけ少なくすむメチロトロフ酵母を選択することとした。選択の指標として酵母細胞壁のNMRのデータ（図3）（P. A. J. Gorinら編、Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 23, 367-417 (1968)）より、 $\alpha$ -1,2マンノシド結合に由来する4.3ppm付近のシグナルを主としたピークとして有し、かつ $\alpha$ -1,3マンノシド結合に由来する4.4ppm付近のシグナルを有さず、その他4.5ppm以上のシグナルを有さない育種に適した株の1次選択を行い、更に菌体より細胞表層のマンノプロテイン由来N-結合型糖鎖を抽出し $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ消化、HPLCによる分析による2次選抜を行った。2次選択を行ったメチロトロフ酵母にはCandida succihila IFO 1911株、Ogataea minuta IFO10746株を使用した。同時に糖鎖の非還元末端に $\alpha$ 1,3マンノシド結合を有するSaccharomyces cerevisiae、及び前述のNMRのデータで4.5ppm以上にピークを有するメチロトロフ酵母であるCandida boidinii ATCC48180株を対象として分析に供した。

### 【0134】

上記菌株を含むYPD培地50 mlを500 ml容坂口フラスコに入れ、30℃で24～48時間培養し、菌体を遠心分離によって集め、10 mlの100 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）に懸濁し、オートクレーブ中で121℃、1時間加熱した。冷却後、遠心分離し、上清を取り、固形物は、もう一度10 mlの水を加えて同様に加熱、遠心分離し、上清を集めた。全抽出液を合わせて、3倍量のエタノール中に注加した。生じた白色の沈殿物を乾燥させた。これをコンカナバリンA（ConA）カラム用緩衝液（0.15 M塩化ナトリウム、0.5 mM塩化カルシウムを含む0.1 M リ

ン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2)) に溶解し、ConA-アガロースカラム (0.6 x 2 cm、ホーネンコーポレーション社製) に供し、ConAカラム用緩衝液で洗浄後、0.2 Mの $\alpha$ -メチルマンノシドを含むConAカラム用緩衝液で溶出を行なった。コンカナバリンAはC-3, C-4, C-6位の水酸基が未置換の $\alpha$ -D-マンノース残基を2残基以上含む糖鎖に対して親和性を示すレクチンであり、これをカラムに固定することで、酵母細胞壁多糖であるグルカンやキチンなどとマンナン蛋白質を分離することができる (Peat et al., J. Chem. Soc., 29 (1961))。得られた画分を透析し、凍結乾燥を行なってマンナン蛋白質を得た。

## 【0135】

次に得られたマンナン蛋白質に対し、酵素処理を施しAsn結合型糖鎖を切りだした。すなわち、凍結乾燥標品を100  $\mu$ lのN-グリコシダーゼF用緩衝液 (0.5% SDS, 0.35% 2-メルカプトエタノールを含む0.1 M Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)) に溶解し、5分間煮沸処理をした。室温まで戻した後、50  $\mu$ lの7.5% Nonidet P-40、138  $\mu$ lのH<sub>2</sub>O、12  $\mu$ lのN-glycosidase F (ベーリンガー社製) を加え、37℃、16時間処理した。BioRad AG501-X8カラムで脱塩後、等量のフェノール：クロロホルム (1:1) を加え激しく振盪して、界面活性剤と蛋白質を除去し、糖鎖調製品とした。

## 【0136】

得られた糖鎖を蛍光標識 (ピリジルアミノ化、PA化という) するため、以下の操作を行なった。糖鎖調製品を濃縮乾固後、40  $\mu$ lのカップリング試薬 (552 mgの2-アミノピリジンを200  $\mu$ lの酢酸に溶解した) を加え、密封し、90℃、60分処理した。室温まで戻した後、140  $\mu$ lの還元試薬 (200 mgのボラン・ジメチルアミン複合体を50  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oと80  $\mu$ lの酢酸に溶解した) を加え、密封し、80℃、80分処理した。反応後、アンモニア水を200  $\mu$ l加えた後、さらに等量になるようにフェノール：クロロホルム (1:1) を加え、激しく振盪してPA化オリゴ糖を含む水層を回収した。これを7回繰り返す、未反応の2-アミノピリジンを除去した。上清について0.22  $\mu$ mのフィルターで濾過し、PA化オリゴ糖調製品とした。

## 【0137】

得られた糖鎖を Aspergillus saitoi  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ (生化学工業製)

により消化した後、HPLCを用いて分析を行った。アミドカラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその鎖長によって分離することが可能である。HPLCの条件は以下の通りである。

カラム：TSK-Gel Amido-80 (4.6 x 250 mm、東ソー製)

カラム温度：40度

流速：1 ml

溶出条件：A：200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 65% アセトニトリル

B：200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 30% アセトニトリル

0分 A=100% 50分 A=0%の直線濃度勾配

励起波長：320nm

蛍光波長：400nm

#### 【0138】

その結果を図4に示す。その結果、Ogataea minuta、及びCandida succiphila由来のN結合型糖鎖は $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ処理によって、Man5もしくはMan6の単位まで低分子化することがわかり、OCH1遺伝子の不活化と $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ発現によって、Saccharomyces cerevisiaeにおけるoch1、mnn1、mnn4株相当の糖鎖変異株（Man5生産株）の育種が可能であると考えられた。一方、Candida boidiniiについては、かなりの割合で未分解の糖鎖が残存した。これは糖鎖の末端に $\alpha$ -1,2マンノシド結合でないユニットが結合しているものと考えられた。またコントロールとしてのSaccharomyces cerevisiaeについても未分解の糖鎖が残存したが、これはMNN1遺伝子の作用による $\alpha$ -1,3マンノースの付加によるものと考えられた。

#### 【0139】

【実施例2】 Ogataea minutaのグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAP）遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりGAP遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行った。

##### （2-1）プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号；P00359) 及びPichia pastoris

(GenBank登録番号 ; Q92263)由来のグリセロアルデヒド-3- リン酸デヒドロゲナーゼで保存されているアミノ酸配列

AYMFKYDSTHG (配列番号 1)

DGPSHKDWRGG (配列番号 2)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PGP5; 5' - GCNTAYATGTTTAAARTAYGAYWSNACNCAYGG -3' (配列番号 3)

PGP3; 5' - CCNCCNCKCCARTCYTTRTGNSWNGGNCCTC -3' (配列番号 4)

プライマーPGP5はアミノ酸配列AYMFKYDSTHGに対応し、プライマーPGP3はアミノ酸配列DGPSHKDWRGGに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

#### 【 0 1 4 0 】

YPD培地 (酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%、pH6.0) で定常期まで培養したOgataea minuta IF010746株の菌体より、酢酸カリウム法 (Methods in yeast genetics.(1986) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.) によって染色体DNAを調製した。

#### 【 0 1 4 1 】

得られたOgataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPGP5、PGP3を用いて、Ex Taqポリメラーゼ (宝酒造社) によるPCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で45秒) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.5kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社) を用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、BigDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ社) を用いて塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae 及びPichia pastoris由来のGAP遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.5kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### 【 0 1 4 2 】

(2-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNAをHybond N+ナイロンメンブレン (ア

マシヤム社)にトランスファーした。実施例(2-1)で得られたDNA断片をメガプライマーDNAラベリングシステム(アマシヤム社)を用いて放射性標識し、サザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションは、常法(Molecular cloning 2nd edn., ed.Sambrook, J., et al., Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A.,1989)に従って行った。その結果、約6kbのHindIII-EcoRV断片にGAP遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIとEcoRVで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIとHincIIで切断したpUC118とライゲーションした後、Hanahanの方法(Gene, 10, 63 (1980))で大腸菌DH5 $\alpha$ 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

## 【0143】

約4000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた11個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMGP1を保持するクローンを選抜した。

## 【0144】

## (2-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMGP1(図5)のHindIII-BamHI領域をdouble-stranded Nested Deletion Kit(ファルマシア社)を用いた欠失変異体及びプライマーウォーキング法により、塩基配列を決定した。得られた塩基配列をつなぎ合わせるにより、配列番号5に示す塩基配列が得られた。

## 【0145】

配列番号5の塩基配列には、1492番目から始まり、2502番目で終わる1011塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号6)と、Saccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼとの相同性を調べたところ、それぞれ77%、81%のアミノ酸が同一であった。

## 【0146】



### 〔実施例3〕 GAP遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った発現カセットの構築

Ogataea minutaのGAP遺伝子プロモーター（配列番号7）とターミネーター（配列番号8）との間に、外来遺伝子を導入する発現カセットを作製した。実施例2-2記載のpOMGP1から3.2kbのHindIII-BamHI断片を単離し、pBluscript II SK-のHindIII-BamHI間に導入した。得られたプラスミドをpOMGP2と命名した（図5）。pOMGP2から3kbのHindIII-KpnI断片を単離し、EcoRI部位を平滑末端処理したpUC19のHindIII-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMGP3と命名した（図5）。GAP遺伝子プロモーターとターミネーターとの間にSalI、EcoT22I部位を導入するために、プライマー5'-GTTTGAATTCACCTCAATTAACATACACAAATACAATACAAAGTCGACAAAATGCATGTGGATAGATGACCAATGGCCTCTTTAAGTAAACATTCGTTTGAATATATTTTC-3'（配列番号9）と5'-TTTTTACTAGTACGGTACCGCTCGAATCGACACAGGAG-3'（配列番号10）を合成した。これらプライマーを用いて、pOMGP2を鋳型としたPCR（94℃で30秒、55℃で1分、72℃で45秒）×20サイクルを行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。0.6kbの挿入DNA断片をEcoRI-KpnI断片として単離し、pOMGP3のEcoRI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMGP4（図5）と命名した。pOMGP4はSalI-EcoT22I間に外来遺伝子を導入し得るGAP遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを有している。

【0147】

### 〔実施例4〕 G418耐性遺伝子発現カセットの構築

抗生物質G418耐性選抜による形質転換を行うためにG418耐性遺伝子（アミノグリコシドフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子）の発現カセットを含むプラスミドを構築した。実施例3で構築したpOMGP4のSalI-EcoT22I間に、プラスミドpUC4K（アマシャムファルマシア社）からXhoI-PstI断片として単離される1.1kbのG418耐性遺伝子を導入した。得られたプラスミドをpOMKmR1と命名した。

【0148】

### 〔実施例5〕 Ogataea minutaのオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素（URA3）遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりURA3遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(5-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; K02207) 及びPichia pastoris (GenBank登録番号 ; AF321098)由来のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素で保存されているアミノ酸配列

GPYICLVKTHID (配列番号 1 1)

GRGLFGKGRDP (配列番号 1 2)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PUR5; 5' - GGNCCNTAYATHGTGYTNGTNAARACNCAYATHGA -3' (配列番号 1 3)

PUR3; 5' - GGRTCCKNCCYTTNCCRAANARNCCNCKNCC -3' (配列番号 1 4)

プライマーPUR5はアミノ酸配列GPYICLVKTHIDに対応し、プライマーPUR3はアミノ酸配列GRGLFGKGRDPに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

【 0 1 4 9 】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPUR5、PUR3を用いて、PCR ( (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で30秒) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

【 0 1 5 0 】

(5-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例 (5-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例 (2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約4.5kbのHindIII断片にURA3遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIで切断し、ア

ガロース電気泳動後、4.5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIで切断したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5 $\alpha$ 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

## 【0151】

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた3個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMUR1を保持するクローンを選抜した。

## 【0152】

## (5-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMUR1のNotI-HindIII領域(図6)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号15に示す塩基配列が得られた。

## 【0153】

配列番号15の塩基配列には、1732番目から始まり、2529番目で終わる798塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号16)とSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のオロチジン-5'-リン酸脱炭酸酵素との相同性を調べたところ、それぞれ82%、75%のアミノ酸が同一であった。

## 【0154】

〔実施例6〕 Ogataea minuta URA3遺伝子破壊株の作製

ポップイン・ポップアウト法(Rothstein R., Methods Enzymol., 194 (1991), 281)により、Ogataea minuta URA3遺伝子破壊株を作製した。

## (6-1) URA3遺伝子破壊ベクターの作製

実施例(5-2)に記載のプラスミドpOMUR1(図6)より3kbのNotI-KpnI断片を単離し、pBluescript II SK-のNotI-KpnI間に導入した。本プラスミドをNotIとStyIで切断後、平滑末端処理、セルフライゲーションすることによって、プラスミドpOMUM1(図6)を取得した。プライマー、5'-ATGGAGAAAAAACTAGTGGATATACCACC-3'(配列番号17)、5'-CTGAGACGAAAAAGATATCTCAATAAACCC-3'(配列番号18)を用いて、プラスミドpHSG398(宝酒造社)を鋳型としたPCR(94℃で30秒

、55℃で1分、72℃で45秒) ×20サイクル) を行い、クロラムフェニコール耐性遺伝子の一部を増幅した。得られた0.4kbの増幅DNA断片をSpeIとEcoRV切断した後、pOMUM1のSpeI-RcoRV間に導入した。得られたプラスミドをpOMUM2と命名した。

#### 【0155】

実施例4で作製したGAP遺伝子プロモーター、ターミネーターによるG418耐性遺伝子発現カセットを有するプラスミドpOMKmR1を、HindIIIで切断し、平滑末端処理後、KpnIリンカーとライゲーションした。本プラスミドよりG418耐性遺伝子発現カセットを3kbのKpnI断片として単離し、pOMUM2のKpnIに導入した。得られたプラスミドをpDOMU1と命名した(図6)。

#### 【0156】

##### (6-2) 形質転換

実施例(6-1)で構築したpDOMU1をSalIで切断し、*Ogataea minuta* IF010746株に電気パルス法にて形質転換した。YPD培地で一晩30℃にて前培養し、100mlのYPD培地に植菌して30℃にて対数増殖期( $OD_{600} = 1.5$ 程度)にまで8~16時間培養した。1400 × gで5分間の遠心分離により集菌し、菌体を100mlの氷冷した滅菌水で1回、続いて40mlの氷冷した滅菌水で1回洗浄した。菌体を20mlのLCバッファー(100mM LiCl、50mM カリウムリン酸バッファー pH 7.5)に懸濁し、30℃で45分間振盪した後、0.5mlの1M DTTを添加し、さらに15分間振盪した。氷冷したSTMバッファー(270mM sucrose、10mM Tris-HCl バッファー pH 7.5、1mM  $MgCl_2$ ) 80mlで洗浄した後、320  $\mu$ lのSTMバッファーに懸濁した。電気パルスによる形質転換実験はバイオラッド社のジーンパルサーを用いて行なった。50  $\mu$ lの菌体懸濁液と5  $\mu$ lのDNA試料とを混合した後、0.2cmのディスポーザブルキューベットに入れ、適当な条件(電圧; 1.0~1.5kv、抵抗; 200~800  $\Omega$ )の電気パルスを加えた。パルス後、1mlの氷冷した1Mソルピトールを含むYPD培地を加え、30℃で4~6時間振盪培養した。培養後、菌液を400~1000  $\mu$ g/mlのG418を含むYPD選択培地に塗布した後、プレートを30℃で培養して、形質転換体コロニーを得た。

#### 【0157】

URA3遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した

(それぞれのプライマーの位置は図7参照)

DU5; 5'-AGGAAGAAGAGGAGGAAGAGGAAGAAAC-3' (配列番号 19)

DUC5; 5'-CGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGG-3' (配列番号 20)

DU3; 5'-CCGTGTTTGTGAGTTTGTGAAAAACAGGGC-3' (配列番号 21)

DUC3; 5'-TGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCC-3' (配列番号 22)

#### 【0158】

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDU5、DUC5を用いて、PCR ( (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。図7に示すように、プラスミドがURA3座に組み込まれた株からは、1.1kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸 (5-FOA) に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の取得は実験書 (Methods Enzymol., 154 (1987), 164) に記載の方法に従った。5-FOA耐性株の染色体DNAをを鋳型とし、プライマーDU5、DU3を用いたPCR ( (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分) ×25サイクル)、プライマーDU5、DUC5を用いたPCR ( (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル)、DU3、DUC3を用いたPCR ( (94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。図7に示すように、G418耐性遺伝子が欠落し、URA3遺伝子のORFがクロラムフェニコール耐性遺伝子部分領域に置換された株から、プライマーDU5、DU3を用いたPCRより2.6kb、プライマーDU5、DUC5を用いたPCRより1.1kb、プライマーDU3、DUC3を用いたPCRより1.0kbの増幅DNA断片が検出された。該酵母をOgataea minuta TK1-3株 (ura3Δ) と命名した。

#### 【0159】

##### 〔実施例7〕 Ogataea minutaのADE1遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりADE1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

##### (7-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号M61209) 及びCandida maltosa (GenBank登録番号; M58322)由来のADE1遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列 FVATDRISAYDVIM (配列番号 23)

QDSYDKQFLRDWLT (配列番号 2 4)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PAD5: 5' - TTYGTNGCNACNGAYMGNATHWSNGCNTAYGAYGTNATHATG -3' (配列番号 2 5)

PAD3: 5' - GTNARCCARTCNCKNARRAAYTGYYTTRTCRTANSWRTCYTG-3' (配列番号 2 6)

プライマーPAD5はアミノ酸配列FVATDRISAYDVIMに対応し、プライマーPAD3はアミノ酸配列QDSYDKQFLRDWLTに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

#### 【0 1 6 0】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPAD5、PAD3を用いて、PCR ( (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.7kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びCandida maltosa由来のADE1遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。

0.7kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### 【0 1 6 1】

##### (7-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例 (7-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例 (2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約5kbのHindIII-BamHI断片にADE1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIとBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIとBamHIで切断したpBluescript II SK-とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

#### 【0 1 6 2】

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた9個の陽性クローンの中から、プラ

スミドpOMAD1を保持するクローンを選抜した。

【0163】

### (7-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMAD1のEcoRV-SmaI領域(図8)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号27に示す塩基配列が得られた。

【0164】

配列番号27の塩基配列には、939番目から始まり、1850番目で終わる912塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号28)とSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のADE1遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ69%、74%のアミノ酸が同一であった。

【0165】

### 〔実施例8〕 Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、ADE1遺伝子を破壊した。

#### (8-1) ADE1遺伝子破壊ベクターの作製

図8に示すように、ADE1構造遺伝子の約70bp領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMAD1を作製した。ADE1遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例5に記載のURA3遺伝子領域を有するプラスミドpOMUR1を鋳型とし、プライマー5'-CCCCGAGCTCAAAAAAAGGTACCAATTTTCAGCTCCGACGCCGGAGCCCACTACGGCTAC-3' (配列番号29)、GGGAAGCTTCCCCAGTTGTACACCAATCTTGTGCGACAG-3' (配列番号30)を用いて、PCR(94℃で30秒、50℃で1分、72℃で45秒)×20サイクル)を行い、URA3構造遺伝子上流領域を増幅した。増幅された約0.8kbのDNA断片を回収し、SacIとHindIII切断した後、pUC18のSacI-HindIII間に導入した。得られたプラスミドのSacI-KpnI間にpOMUR1から単離した3.3kbのSacI-KpnI断片を導入した。得られたプラスミドをKpnI切断、平滑末端処理、セルフライゲーションした。得られたプラスミドをpOMUR2と命名した(図9)。pOMUR2をStyI切断、平滑末端処理、BglIIIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをp

ROMU1と命名した。pROMU1をBglIIIとHindIIIで切断して得られる4.3kbのDNA断片には、URA3構造遺伝子の前後に約0.8kbの反復配列が存在することになる（図9）。

# 【0166】

実施例7に記載のADE1遺伝子領域を有するプラスミドpOMAD1を鋳型とし、プライマーDad1-5；5'-AAAAAGCGGCGCTCCCGGTGTCCCGCAGAAATCTTTATGCGTAGTCTTG-3'（配列番号31）、Dad1-3；5'-CCCCCGGATCCTTTTTTTTAAGCTTGTTGTACTCCTTCCATGCACTTCCGGTGATG-3'（配列番号32）を用いたPCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分）×20サイクル）、プライマーDad2-5；5'-TTTTCACCCCGTCAAGGATCCCTGAACAAGGCGAACACGACGAAAAACATTTCCCCCGAG-3'（配列番号33）、Dad2-3；5'-TTT TTGGGCCACCTGGGTGAAGATTTGCCAGATCAAGTTCTCC-3'（配列番号34）を用いたPCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分）×20サイクル）を行った。増幅されたそれぞれ約0.7kb、1kbのDNA断片を回収し、それぞれNotIIとBamHI、及びBamHIとApaIで切断した。得られたNotI-BamHIとBamHI-ApaIの両DNA断片をpBluescript I I SK-のNotI-ApaI間に導入した。得られたプラスミドのBamHI-HindIII間にpROMU1から単離した4.3kbのBglIII-HindIII断片を導入した。得られたプラスミドをpDOMAD1と命名した（図8）。

# 【0167】

## （8-2）形質転換

実施例（8-1）で得られたpDOMAD1をApaIとNotIで切断して、実施例（6-2）で得られたOgataea minuta TK1-3株（ura3Δ）に電気パルス法で形質転換を行った。ade1形質を示す株はアデニン生合成中間代謝産物の赤色色素を産生する。よってコロニーが赤く染まることから、形質転換体よりコロニーが赤く染まる株を選択した。これらの株のADE1遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した（それぞれのプライマーの位置は図10参照）

DA5；5'-GATGCTTGCGCCTTCAACCACATACTCCTC-3'（配列番号35）

DA3；5'-AAAAGTTCTTGACAGCCTCAATATTGACC-3'（配列番号36）

DOU5；5'-ATCGATTTGGAGTGTGTTGTCCAGGTCGGG-3'（配列番号37）

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーDA5、DOU5を用いて



、PCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で2分）×25サイクル）を行った。図10に示すように、プラスミドがADE1座に組み込まれた株からは、1.6kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマー-DA5、DA3を用いたPCR（（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分）×25サイクル）を行った。図10に示すように、URA3遺伝子が欠落した株から、2.9kbの増幅DNA断片が検出された。このura3Δ ade1Δ株をOgataea minuta TK 4-1株と命名した。

【0168】

〔実施例9〕 Ogataea minutaのOCH1遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりOCH1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

（9-1）プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae（GenBank登録番号；P31755）及びPichia pastoris（特開平9-3097）由来のOCH1遺伝子産物で保存されているアミノ酸配列

PQH(R)I(V)WQTWKV（配列番号38）

WYARRIQFCQW（配列番号39）

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

POH5；5'-CCNCARCRYRTHTGGCARACNTGGAARGT-3'（配列番号40）

POH3；5'-CCAYTGRCARAAYTGDATNCKNCKNGCRTACCA-3'（配列番号41）

プライマーPOH5はアミノ酸配列PQH(R)I(V)WQTWKVに対応し、プライマーPOH3はアミノ酸配列WYARRIQFCQWに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

【0169】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPOH5、POH3を用いて、PCR（（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で30秒）×25サイクル）を行った。増幅された約0.4kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のOCH1遺伝子産物のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコード

する塩基配列が有するクローンを選抜した。0.4kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### 【0170】

##### (9-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(9-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約5kbのXbaI断片にOCH1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをXbaIで切断し、アガロース電気泳動後、5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をXbaIで切断したpBluescript II SK-とライゲーションした後、大腸菌DH5 $\alpha$ 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

#### 【0171】

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた4個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMOC1を保持するクローンを選抜した。

#### 【0172】

##### (9-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMOC1のBglIII-SpeI領域(図11)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号42に示す塩基配列が得られた。

#### 【0173】

配列番号42の塩基配列には、508番目から始まり、1812番目で終わる1305塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号43)とSaccharomyces cerevisiae及びPichia pastoris由来のマンノース転移酵素OCH1遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ42%、29%のアミノ酸が同一であった。特開平9-3097に開示されたPichia pastoris由来のOCH1遺伝子とのアミノ酸の相同性が29%であること、Pichia pastoris由来のOCH1遺伝子がSaccharomyces cerevisiae由来のOCH1遺伝子( $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼ)の活性を有するかど

うか調べられていないこと等より、特開平9-3097に開示されたPichia pastoris由来のOCH1遺伝子が実質的にOCH1遺伝子 ( $\alpha$ -1,6マンノシルトランスフェラーゼ) をコードしているのかどうか、また本実施例及び実施例10及び11に記載したOgataea minutaのOCH1遺伝子の機能を有するかどうかについては不明である。

【0174】

〔実施例10〕 Ogataea minutaのOCH1遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、OCH1遺伝子を破壊した。

(10-1) OCH1遺伝子破壊ベクターの作製

OCH1遺伝子の約0.5kbのB<sup>al</sup>I-S<sup>ma</sup>I領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOM OCH1を作製した(図11)。OCH1遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、実施例(8-1)に記載した構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。

【0175】

pOMOC1より4.4kbのNotI-XbaI断片を単離し、pBluescript II SK-のNotI-XbaI間に導入した。得られたプラスミドをpOMOC2と命名した。pOMOC2をAccIとXhoIで切断し、平滑末端処理、セルフライゲーションした。得られたプラスミドをpOMOC3と命名した。pOMOC2をB<sup>al</sup>I切断し、BamHIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをpOMOC2Bと命名した(図11)。pOMOC3をS<sup>ma</sup>I切断し、HindIIIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドをpOMOC3Hと命名した(図11)。pOMOC2BのBamHI-HindIII間に実施例(8-1)に記載したpROMU1から単離した4.3kbのB<sup>gl</sup>III-HindIII断片を導入した。得られたプラスミドのHindIII-ApaI間にpOMOC3Hから単離した1.5kbのHindIII-ApaI断片を導入した。得られたプラスミドをpDOMOCH1と命名した(図11)。

【0176】

(10-2) 形質転換

実施例(10-1)で得られたpDOMOCH1をApaIとNotIで切断して、実施例(6-2)で得られたOgataea minuta TK1-3株(ura3Δ)、及び実施例(8-2)で得られたOgataea minuta TK4-1株(ura3Δ ade1Δ株)に電気パルス法で形質転換を行った。形質

転換は実施例(6-2)に記載の方法に順じて行った。

# 【0177】

OCH1遺伝子が破壊されたことを確認するために、以下のプライマーを合成した  
(それぞれのプライマーの位置は図12参照)

D03; 5'-CCATTGTCAGCTCCAATTCTTTGATAAACG-3' (配列番号44)

DOU5; 5'-ATCGATTTCGAGTGTGTTGTCCAGGTCCGGG-3' (配列番号37)

D05; 5'-ACACTTCGGTAAGTTCCAAGAGACATGGCC-3' (配列番号45)

D03-2; 5'-TCACCACGTTATTGAGATAATCAAACAGGG-3' (配列番号46)

# 【0178】

形質転換株から単離した染色体DNAを鋳型とし、プライマーD05、DOU5を用いて、PCR((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分)×25サイクル)を行った。図12に示すように、プラスミドがOCH1座に組み込まれた株からは、2.4kbの増幅DNA断片が検出された。選抜した株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸(5-FOA)に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーD03、D05を用いたPCR((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分)×25サイクル)、プライマーD05、D03-2を用いたPCR((94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分)×25サイクル)を行った。図12に示すように、URA3遺伝子が欠落した株から、プライマーD03、D05を用いたPCRより2.4kb、プライマーD05、D03-2を用いたPCRより0.9kbの増幅DNA断片が検出された。得られたoch1Δ ura3Δ株をOgataea minuta TK3-A株、och1Δ ura3Δ adelΔ株をOgataea minuta TK5-3株と命名した。

# 【0179】

[実施例11] Ogataea minuta OCH1遺伝子破壊株からの細胞表層マンナン蛋白質の分離とその含有糖鎖の構造解析

Ogataea minuta OCH1遺伝子破壊株TK 3-A株及びその親株であるTK 1-3株の細胞表層マンナン蛋白質の糖鎖構造解析を行った。PA化オリゴ糖の調製は実施例1に記載の方法にて行った。

# 【0180】

調製した糖鎖を Aspergillus saitoi α-1,2-マンノシダーゼ(生化学工業製)

により消化した。HPLCを用いて分析を行った。アミドカラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその鎖長によって分離することが可能である。また逆相カラムを用いたHPLCでは、PA化オリゴ糖をその疎水度によって分離し、糖鎖構造を確認することが可能である。HPLCの条件は以下の通りである。

## 【0181】

## 1) アミドカラムによるサイズ分析

カラム：TSK-Gel Amido-80 (4.6 x 250 mm、東ソー製)

カラム温度：40度

流速：1 ml

溶出条件：A: 200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 65%アセトニトリル

B: 200 mM酢酸トリエチルアミン pH7.0 + 30%アセトニトリル

0分 A=100% 50分A=0%の直線濃度勾配

## 【0182】

## 2) 逆相カラムによる構造解析

カラム：TSK-Gel ODS80TM (4.6 x 250 mm、東ソー製)

カラム温度：50度

流速：1.2 ml

溶出条件：0.15% n-ブタノールを含む100 mM酢酸アンモニウム pH6.0

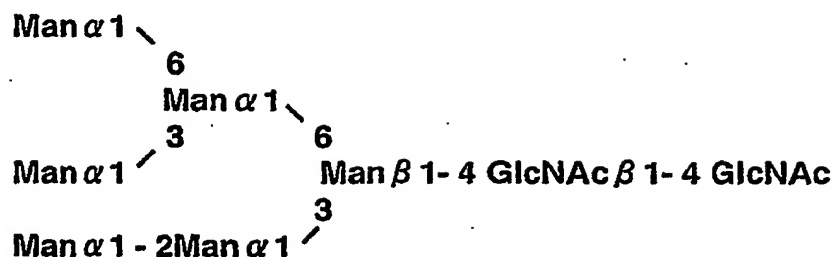
## 【0183】

その結果を図13に示す。アミドカラムによるサイズ分析により、親株であるTK 1-3株については図13に示すようにMan5とともにMan6を生成したが、 $\Delta$ 0CH1株であるTK 3-A株はMan5を主に生成した。また逆相カラムによる構造解析を行い、市販のスタンダード糖鎖（宝酒造）と比較した結果、TK 1-3株のMan6は下記構造式1、Man5は下記構造式2の構造を有する糖鎖、一方TK 3-A株のMan5は下記構造式2の構造を有する糖鎖であることが判った。

## 【0184】

【化 7】

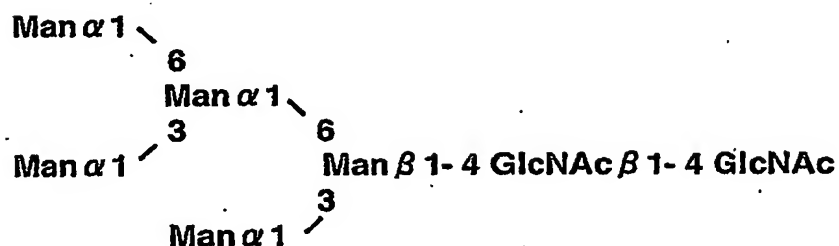
構造式1



【0185】

【化 8】

構造式2



【0186】

以上の結果より、取得した遺伝子は実質的にOgataea minuta OCH1遺伝子であること、該株において効果的に $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを発現させることによりSaccharomyces cerevisiaeにおけるoch1、mnn1、mnn4株に $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現させた株相当の糖鎖変異株の育種が可能であることが確認された。

【0187】

〔実施例12〕 Ogataea minutaのプロテイナーゼA(PEP4)遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりプロテイナーゼA\_PEP4遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

## (12-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae(GenBank登録番号 ; M13358)、Pichia angusta (GenBank登録番号 ; U67173))由来のPEP4で保存されているアミノ酸配列

TNYLNAQY (配列番号 47)

KAYWEVKF (配列番号 48)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PPA5; 5' - ACNAAYTAYYTNAAYGCNCARTA -3' (配列番号 49)

PPA3; 5' - AAYTTNACYTCCARTANGCYTT -3' (配列番号 50)

プライマーPPA5はアミノ酸配列TNYLNAQYに対応し、プライマーPPA3はアミノ酸配列KAYWEVKFに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

## 【0188】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPPA5、PPA3を用いて、PCR (94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル)を行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae、Pichia angusta由来のPEP4遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.6kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

## 【0189】

## (12-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(12-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(6-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約6kbのBamHI断片にPEP4遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

## 【0190】

約5000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた8個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMPA1を保持するクローンを選抜した。

## 【0191】

## (12-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMPA1のNdeI-XbaI領域(図14)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号51に示す塩基配列が得られた。

## 【0192】

配列番号51の塩基配列には、491番目から始まり、1720番目で終わる1233塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号52)とSaccharomyces cerevisiae、Pichia angusta由来のPEP4との相同性を調べたところ、それぞれ67%、78%のアミノ酸が同一であった。

## 【0193】

[実施例13] Ogataea minutaのPEP4遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、PEP4遺伝子を破壊した。

(13-1) PEP4遺伝子破壊ベクターの作製

図14に示すように、PEP4構造遺伝子の約1.1kbのSmaI-XbaI領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMPA1を作製した。PEP4遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(12-2)に記載のPEP4遺伝子領域を有するプラスミドpOMPA1をSacI切断、セルフライゲーション、ClaI切断、セルフライゲーションしたプラスミドを作成した。

## 【0194】

得られたプラスミドをSmaIで切断し、HindIIIリンカーとライゲーション、XbaIで切断、平滑末端処理し、BglIIIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドのBglIII-HindIII間に、実施例(8-1)に記載のpROMU1から単離した4.3k



bのBglIII-HindIII断片と導入した。得られたプラスミドをpDOMPA1と命名した（図14）。

#### 【0195】

##### (13-2) 形質転換

実施例(13-1)で得られたpDOMPA1をSacI-ClaIで切断して、実施例(10-2)で得られたOgataea minuta TK3-A株（och1Δura3Δ）、及びOgataea minuta TK5-3株（och1Δura3Δ adel1Δ株）に電気パルス法で形質転換を行った。

#### 【0196】

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、PEP4遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPA1から単離した4.8kbのSacI-ClaI断片（図14）をプローブとしてサザン解析を行ったところ、宿主株では6kbにバンドが検出されるが、破壊株では9kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPA1から単離した4.8kbのSacI-ClaI断片（図14）をプローブとして再度サザン解析を行い、5.5kbの位置にバンドが検出されるURA3遺伝子が除去された株を選択した。得られたoch1Δpep4Δura3Δ株をOgataea minuta TK6株、och1Δpep4Δura3Δadel1Δ株をOgataea minuta TK7株と命名した。

#### 【0197】

##### 〔実施例14〕 Ogataea minutaのPRB1遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりPRB1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

##### (14-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号 ; M18097)、Kluyveromyces lactis (GenBank登録番号 ; A75534)由来のPRB1及びその遺伝子ホモログで保存されているアミノ酸配列

DG(L)NGHGTHCAG（配列番号53）

GTSMAS(T)PHV(I)A(V)G（配列番号54）

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PPB5: 5' - GAYBKNAAYGGNCAYGGNACNCAYTGKCNCGG -3' (配列番号 5 5)

PPB3: 5' - CCNRCNAYRTGNGGNWSNGCCATNWSNGTNC -3' (配列番号 5 6)

プライマーPPB5はアミノ酸配列DG(L)NGHGTHCAGに対応し、プライマーPPB 3はアミノ酸配列GTSMAS(T)PHV(I)A(V)Gに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

#### 【 0 1 9 8 】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPPB5、PPB3を用いて、PCR ( (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約0.5kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にPichia pastoris及びKluyveromyces lactis由来のPRB1遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.5kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### 【 0 1 9 9 】

##### (14-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例 (14-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例 (2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約5kbのBamHI断片にPRB1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、5kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断、BAP処理したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

#### 【 0 2 0 0 】

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた2個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMPBIを保持するクローンを選抜した。

#### 【 0 2 0 1 】

## (14-3) 塩基配列決定

プラスミド pOMPBI の BamHI-HindIII 領域 (図15) の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号 57 に示す塩基配列が得られた。

## 【 0 2 0 2 】

配列番号 57 の塩基配列には、394番目から始まり、2013番目で終わる1620塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列 (配列番号 58) と *Pichia pastoris* 及び *Kluyveromyces lactis* 由来の PRB1 との相同性を調べたところ、それぞれ47%、55%のアミノ酸が同一であった。

## 【 0 2 0 3 】

〔実施例15〕 *Ogataea minuta* の PRB1 遺伝子破壊株の作製

*Ogataea minuta* の URA3 遺伝子をマーカーとした形質転換によって、PRB1 遺伝子を破壊した。

## (15-1) PRB1 遺伝子破壊ベクターの作製

図15に示すように、PRB1 構造遺伝子の約0.2kbの ClaI-SphI 領域を URA3 遺伝子に置換したプラスミド pDOMPBI を作製した。PRB1 遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持った URA3 遺伝子をマーカーとして用いた。実施例 (14-2) に記載の PRB1 遺伝子領域を有するプラスミド pOMPBI から BamHI 断片を単離し、BamHI で切断し、BAP処理した pTV19Δ Sph (SphI で切断し、平滑末端処理しセルフライゲーションし、SphI サイトを除去した pTV19) に導入した。得られたプラスミドの ClaI-SphI 間に、実施例 (8-1) に記載の pROMU1 の BglII サイトを ClaI サイトに、HindIII サイトを SphI サイトにそれぞれリンカーライゲーション法により変更したプラスミドから単離した4.3kbの ClaI-SphI 断片と導入した。得られたプラスミドを pDOMPBI と命名した (図15)。

## 【 0 2 0 4 】

## (15-2) 形質転換

実施例 (15-1) で得られた pDOMPBI を BamHI で切断して、実施例 (13-2) で得られた *Ogataea minuta* TK6 株 (och1Δ pep4Δ ura3Δ)、及び *Ogataea minuta* TK7 株 (oc

h1  $\Delta$  pep4  $\Delta$  ura3  $\Delta$  ade1  $\Delta$  株) に電気パルス法で形質転換を行った。

# 【0205】

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、P RB1遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPB1から単離した5kbのBamHI断片(図15)をプローブとしてサザン解析を行ったところ、宿主株では5kbにバンドが検出されるが、破壊株では8.5kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸(5-FOA)に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAをBamHIで切断し、pDOMPB1から単離した5kbのBamHI断片(図15)をプローブとして再度サザン解析を行い、5kbの位置にバンドが検出されるURA3遺伝子が除去された株を選択した。得られたoch1  $\Delta$  pep4  $\Delta$  prb1  $\Delta$  ura3  $\Delta$  株をOgataea minuta TK8株、och1  $\Delta$  pep4  $\Delta$  prb1  $\Delta$  ura3  $\Delta$  ade1  $\Delta$  株をOgataea minuta TK9株と命名した。

# 【0206】

## 〔実施例16〕 Ogataea minutaのKTR1遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりKTR1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行った。

### (16-1) プローブの作成

Saccharomyces cerevisiae由来のKTR遺伝子ファミリーで保存されているアミノ酸配列(Biochim. Biophys. Acta, (1999) Vol. 1426, p326)を抽出し

H(N)YDWV(T)FLND(配列番号59)

YNLCHFWSNFEI(配列番号60)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PKR5; 5' - MAYTAYGAYTGGRYNTTYTNAAYGA -3' (配列番号61)

PKR3; 5' - ATYTCRAARTTNSWCCARAARTGRCANARRTTRTA -3' (配列番号62)

プライマーPKR5はアミノ酸配列H(N)YDWV(T)FLNDに対応し、プライマーPKR3はアミノ酸配列YNLCHFWSNFEIに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

# 【0207】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPKR5、PKR3を

用いて、PCR（94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分）×25サイクルを行った。増幅された約0.6kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。60クロンの塩基配列の解析結果、計4種の遺伝子断片が確認され、これらは全て Saccharomyces cerevisiae 由来の KTR 遺伝子ファミリーのアミノ酸配列と高い相同性を有していた。このうち1クローンについて、0.6kbの挿入断片についてプラスミドをEcoRIで消化し、アガロース電気泳動で分離、回収した。

## 【0208】

## (16-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例（12-1）で得られたDNA断片をプローブとして実施例（2-2）に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約2kbのSacI断片に KTR1 遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをSacIで切断し、アガロース電気泳動後、2kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をSacIで切断しBAP処理したpUC18とライゲーションした後、大腸菌DH5 $\alpha$ 株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

## 【0209】

約4000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた2個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMKR1を保持するクローンを選抜した。

## 【0210】

## (16-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMKR1のSacI挿入断片(図16)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号63に示す塩基配列が得られた。

## 【0211】

配列番号63の塩基配列には、124番目から始まり、1335番目で終わる1212塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号64）と Saccharomyces ce

revisiae由来のKTR遺伝子ファミリーであるKTR1、KRE2との相同性を調べたところ、それぞれ53%、49%のアミノ酸が同一であった。

# 【 0 2 1 2 】

## 〔実施例17〕 Ogataea minutaのKTR1遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、KTR1遺伝子を破壊した。

### (17-1) KTR1遺伝子破壊ベクターの作製

図16に示すように、KTR1構造遺伝子の0.3kbのEcoRI-BglII領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMKR1を作製した。KTR1遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例(16-2)に記載のKTR1遺伝子領域を有するプラスミドpOMKR1をHindIII-XbaIで切断、平滑末端処理し、ライゲーションした。得られたプラスミドをEcoRIで切断し、HindIIIリンカーとライゲーションした。得られたプラスミドのBglII-HindIII間に、実施例(8-1)に記載のpROMU1から単離した4.3kbのBglII-HindIII断片と導入した。得られたプラスミドをpDOMKR1と命名した(図16)。

# 【 0 2 1 3 】

### (17-2) 形質転換

実施例(17-1)で得られたpDOMKR1をSacI-ClaIで切断して、実施例(15-2)で得られたOgataea minuta TK8株(och1Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ)、及びOgataea minuta TK9株(och1Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ ade1Δ株)に電気パルス法で形質転換を行った。

# 【 0 2 1 4 】

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、KTR1遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをSacIで切断し、pOMKR1から単離した2kbのSacI断片(図16)をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、宿主株では2kbにバンドが検出されるが、破壊株では5kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸(5-FOA)に耐性を示す株を取得した。5

-FOA耐性株の染色体DNAをSacIで切断し、pOMKR1から単離した2kbのSacI断片（図16）をプローブとして再度サザン解析を行い、2kbの位置にバンドが検出されるU<sub>RA3</sub>遺伝子が除去された株を選択した。得られたoch1Δktr1Δpep4Δprb1Δura3Δ株をOgataea minuta TK10株、och1Δktr1Δpep4Δprb1Δura3Δade1Δ株をOgataea minuta TK11株と命名した。

## 【0215】

Ogataea minuta TK-10株、及びOgataea minuta TK-11株のハイグロマイシンBに対する感受性を調べた。野生株であるOgataea minuta IF010746株では50 μg/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでコロニーが出現するが、Ogataea minuta TK-10株、Ogataea minuta TK-11株では5 μg/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでもコロニーが全く出現しなかった。Saccharomyces cerevisiaeの糖鎖変異株では、ハイグロマイシンB等の薬剤に対する感受性が野生株と比較して上昇することが知られている。よってこれらのOgataea minuta ktr1Δ株も糖鎖が短くなっていることが推察された。

## 【0216】

またこれらのOgataea minuta ktr1Δ株はSaccharomyces cerevisiae och1Δ株と同様に、細胞の沈降性が著しく上昇しており、糖鎖が短くなっていることが推察された。

## 【0217】

【実施例18】 Ogataea minutaのMNN9遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりMNN9遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行なった。

(18-1) プローブの作成Saccharomyces cerevisiae(GenBank登録番号; L23752)、Candida albicans (GenBank登録番号; U63642)由来のMNN9で保存されているアミノ酸配列

TSWVLWLDAD (配列番号65)

ETEGFAKMAK (配列番号66)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PMN5; 5' - ACNWSNTGGGTNYTNTGGYTNGAYGCNGA -3' (配列番号67)

PMN3; 5' - TTNGCCATYTTNGCRAANCCYTNGTYTC -3' (配列番号 68)

プライマーPMN5はアミノ酸配列TSWVLWLDADに対応し、プライマーPMN3はアミノ酸配列ETEGFAKMAKに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

#### 【0218】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPMN5、PMN3を用いて、PCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクルを行った。増幅された約0.4kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にSaccharomyces cerevisiae及びCandida albicans由来のMNN9遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。0.4kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### 【0219】

##### (18-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例(18-1)で得られたDNA断片をプローブとして実施例(2-2)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約8kbのBamHI断片にMNN9遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをBamHIで切断し、アガロース電気泳動後、8kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をBamHIで切断したpUC118とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

#### 【0220】

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた2個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMMN9-1を保持するクローンを選抜した。

#### 【0221】

##### (18-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMMN9-1のApaI-BglII領域(図17)の塩基配列を、欠失変異体及びブラ



イマーウオーキング法により決定し、配列番号69に示す塩基配列が得られた。

# 【0222】

配列番号69の塩基配列には、931番目から始まり、2034番目で終わる1104塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列（配列番号70）とSaccharomyces cerevisiae及びCandida albicans由来のMNN9遺伝子産物との相同性を調べたところ、それぞれ59%、62%のアミノ酸が同一であった。

# 【0223】

## 〔実施例19〕 Ogataea minutaのMNN9遺伝子破壊株の作製

Ogataea minutaのURA3遺伝子をマーカーとした形質転換によって、MNN9遺伝子を破壊した。

### (19-1) MNN9遺伝子破壊ベクターの作製

図17に示すように、MNN9構造遺伝子の約1kbのSal-BglII領域をURA3遺伝子に置換したプラスミドpDOMN9を作製した。MNN9遺伝子破壊株より、再びウラシル要求株を取得するために、構造遺伝子の前後に反復構造を持ったURA3遺伝子をマーカーとして用いた。実施例18に記載のMNN9遺伝子領域を有するプラスミドpOMMN9-1から単離した1.2kbのApaI-SalI断片をpBluescript II SK-のApaI-SalI間に導入した。得られたプラスミドのXbaI-HindIII間にpOMMN9-1から単離した2.2kbのNheI-BglII断片と実施例(8-1)に記載のpROMU1から単離した4.3kbのBglII-HindIII断片とを導入した。得られたプラスミドをpDOMN9と命名した(図17)。

# 【0224】

### (19-2) 形質転換

実施例(19-1)で得られたpDOMN9をApaIで切断して、実施例(15-2)で得られたOgataea minuta TK8株(och1Δpep4Δprb1Δura3Δ)、Ogataea minuta TK9株(och1Δpep4Δprb1Δura3Δade1Δ株)、及び実施例(17-2)で得られたOgataea minuta TK10株(och1Δktr1Δpep4Δprb1Δura3Δ)、Ogataea minuta TK11株(och1Δktr1Δpep4Δprb1Δura3Δade1Δ株)に電気パルス法で形質転換を行った。

# 【0225】

得られた形質転換体についてその染色体DNAのサザン解析を行うことにより、M

NN9遺伝子破壊株をスクリーニングした。すなわち宿主株及び形質転換株の染色体DNAをApaIとBglIIで切断し、pOMMN9-1から単離した1.2kbのApaI-SalI断片（図17）をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、宿主株では2.2kbにバンドが検出されるが、破壊株では5.5kbの位置にバンドが検出された。遺伝子破壊株をYPD培地で定常期まで培養した後、5-フルオロオロチジン酸（5-FOA）に耐性を示す株を取得した。5-FOA耐性株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーDMN5；5'-AGATGAGGTGATTCCACGTAATTTGCCAGC-3'（配列番号71）、及びDMN3；5'-TTTTGATTGTCATCTATTTTCGCACACCCTG-3'（配列番号72）を用いたPCR（94℃で30秒、60℃で1分、72℃で1分）×25サイクルを行った。その結果、URA3遺伝子が欠落した株から、1kbの増幅DNA断片が検出された。得られたoch1Δ mnn9Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ 株をOgataea minuta TK12株、och1Δ mnn9Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ adelΔ 株をOgataea minuta TK13株、och1Δ ktr1Δ mnn9Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ 株をOgataea minuta TK14株、及びoch1Δ ktr1Δ mnn9Δ pep4Δ prb1Δ ura3Δ adelΔ 株をOgataea minuta TK15株と命名した。

## 【0226】

Ogataea minuta TK14株、及びOgataea minuta TK15株のハイグロマイシンBに対する感受性を調べた。野生株であるOgataea minuta IF010746株では実施例(17-2)に記載したように50 μg/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでコロニーが出現するが、Ogataea minuta TK12株、及びOgataea minuta TK13株では20 μg/mlのハイグロマイシンBを含有するプレートでもコロニーが全く出現しなかった。よってこれらのOgataea minuta mnn9Δ 株についても糖鎖が短くなっていることが推察された。

## 【0227】

〔実施例20〕 Ogataea minutaのアルコールオキシダーゼ（AOX1）遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株よりAOX1遺伝子の取得、及びその塩基配列決定を行った。

## (20-1) プローブの作成

Pichia pastoris（GenBank登録番号；U96967、U96968）及び Candida boidini

i (GenBank登録番号 ; Q00922) 由来のアルコールオキシダーゼで保存されているアミノ酸配列

GGGSSINFMMYT (配列番号 7 3)

DMWPMVWAYK (配列番号 7 4)

に対応する塩基配列のオリゴヌクレオチドを以下のように合成した。

PAX5; 5' - GGNGGNGGNWSNWSNATHAAYTTYATGATGTAYAC -3' (配列番号 7 5)

PAX3; 5' - TTRTANGCCCANACCATNGGCCACATRTC -3' (配列番号 7 6)

プライマーPAX5はアミノ酸配列GGGSSINFMMYTに対応し、プライマーPAX3はアミノ酸配列DMWPMVWAYKに対応する塩基配列の相補鎖の配列である。

#### 【 0 2 2 8 】

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを鋳型とし、プライマーPAX5、PAX3を用いて、PCR ( (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×25サイクル) を行った。増幅された約1.1kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。得られたクローンよりプラスミドDNAを単離し、塩基配列を決定した。プラスミドの挿入DNA断片にPichia pastoris及びCandida boidinii由来のアルコールオキシダーゼ遺伝子のアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が有するクローンを選抜した。1.1kbの挿入DNA断片は、プラスミドをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動後、回収した。

#### 【 0 2 2 9 】

(20-2) ライブラリーの作成、及びスクリーニング

Ogataea minuta IF010746株の染色体DNAを種々の制限酵素で切断し、実施例 (20-1) で得られたDNA断片をプローブとして実施例 (2-2) に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約6kbのHindIII断片にAOX1遺伝子が存在すると考えられた。そこでそのDNA断片をクローニングすべく、ライブラリーを作成した。Ogataea minutaの染色体DNAをHindIIIで切断し、アガロース電気泳動後、6kb付近のDNA断片をゲルから回収した。回収したDNA断片をHindIIIで切断したpUC118とライゲーションした後、大腸菌DH5α株に形質転換して、ライブラリーを作成した。

#### 【 0 2 3 0 】

約6000クローンを前述のDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。得られた6個の陽性クローンの中から、プラスミドpOMAX1を保持するクローンを選抜した。

## 【0231】

## (20-3) 塩基配列決定

プラスミドpOMAX1 のHindIII-SmaI領域(図18)の塩基配列を、欠失変異体及びプライマーウォーキング法により決定し、配列番号77に示す塩基配列が得られた。

## 【0232】

配列番号77の塩基配列には、2349番目から始まり、4340番目で終わる1992塩基対からなるオープンリーディングフレームが存在する。このオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸配列(配列番号78)とPichia pastoris及びCandida boidinii由来のアルコールオキシダーゼとの相同性を調べたところ、それぞれ72%、74%のアミノ酸が同一であった。

## 【0233】

【実施例21】 AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った異種遺伝子発現プラスミドの構築

(21-1) AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った発現カセットの構築

Ogataea minutaのAOX1遺伝子プロモーター(配列番号79)とターミネーター(配列番号80)との間に、外来遺伝子を導入する発現カセットを作製した。AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとの間にXbaI、SmaI、BamHI部位を導入するために、以下のプライマーを合成した。

OAP5 ; 5' - CTGCAGCCCCTTCTGTTTTCTTTTGACGG -3' (配列番号81)

OAP3 ; 5' -CCCCCGGATCCAGGAACCCGGGAACAGAATCTAGATTTTTTCGTAAGTCGTAAGTCGTAACA  
GAACACAAGAGTCTTTGAACAAGTTGAG-3' (配列番号82)

OAT5 ; 5' -CCCCCGGATCCGAGACGGTGCCCGACTCTTGTTCAATTCTTTTGG-3' (配列番号83)

OAT3 ; 5' -CCCATAATGGTACCGTTAGTGGTACGGGCAGTC-3' (配列番号84)

## 【 0 2 3 4 】

図18に示すpOMAX1を鋳型とし、プライマーOAP5とOAP3を用いたPCR（（94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分）×20サイクル）、プライマーOAT5とOAT3を用いたPCR（（94℃で30秒、55℃で1分、72℃で1分）×20サイクル）を行った。それぞれの増幅された0.5kb、0.8kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。0.5kb、0.8kbの挿入DNA断片はそれぞれ、PstI-BamHII断片及びBamHI-KpnI断片として単離した。pOMAX1のPstI-BamHII間に前述の0.5kbのPstI-BamHII断片を導入した。その後得られたプラスミドのBamHI-KpnI間に0.8kbのBamHI-KpnI断片を導入した。得られたプラスミドをpOMAXPT1と命名した（図18）。pOMAXPT1はXbaI、SmaI、BamHI部位に外来遺伝子を導入し得るAOX1遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを有している。

## 【 0 2 3 5 】

（21-2）URA3遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例(5-2)に記載のpOMUR1より単離したOgataea minuta URA3遺伝子を含む3.1kbのBglIII-HindIII断片をpUC19のBamHI-HindIII間に導入した。得られたプラスミドをpOMUR5と命名した（図18）。pOMUR5をStyIとSacI切断、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたプラスミドをpOMUR6と命名した。pOMUR6をXbaI切断、平滑末端処理後、ライゲーションさせた。得られたプラスミドをpOMUR-Xと命名した。pOMUR-XをSalI切断、平滑末端処理後、NotIリンカーを導入した。得られたプラスミドをpOMUR-XNと命名した。実施例(21-1)記載のpOMAXPT1より単離したOgataea minuta AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセットを含む3.1kbのHindIII-KpnI断片をpOMUR-XNのHindIII-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex1Uと命名した（図18）。

## 【 0 2 3 6 】

またpOMex1UをBglIII切断、平滑末端処理後、NotIリンカーを導入した。得られたプラスミドをpOMex1U-NOと命名した（図18）。pOMex1U-NOより単離したOgataea minuta AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセットを含む3

.1kbのHindIII-KpnI断片をpOMUR-XのHindIII-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex2Uと命名した（図18）。

#### 【0237】

(21-3) G418耐性遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例4に記載のGAP遺伝子プロモーターとターミネーターによるG418耐性遺伝子発現カセットを有するpOMKmR1をPstI切断、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたプラスミドよりG418耐性遺伝子発現カセットを2.3kbのApaI-KpnI断片として単離し、実施例(21-2)に記載のpOMex1U-N0のApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex3Gと命名した（図18）。

#### 【0238】

(21-4) ADE1遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例7に記載のADE1遺伝子を含むpOMAD1をSmaI切断後、ApaIリンカーを導入、EcoRV切断後、KpnIリンカーを導入、更にBglII切断、平滑末端処理後、NotIリンカーを導入したプラスミドを作成した。得られたプラスミドよりADE1遺伝子発現カセットを3.1kbのApaI-KpnI断片として単離し、pOMex1UをApaI-KpnIして得られた*Ogataea minuta* AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる発現カセットを含むApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex4Aと命名した（図18）。

#### 【0239】

(21-5) ハイグロマイシンB耐性遺伝子を選択マーカーとしたAOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによる異種遺伝子発現プラスミドの構築

抗生物質ハイグロマイシンB耐性選抜による形質転換を行うためにハイグロマイシンB耐性遺伝子（ハイグロマイシンBフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子）の発現カセットを含むプラスミドを構築した。

#### 【0240】

ハイグロマイシンB耐性遺伝子を単離するため、以下のプライマーを合成した

HGP5 ; 5' - GTCGACATGAAAAAGCCTGAACTCACCGC -3' (配列番号 8 5)

HGP3 ; 5' - ACTAGTCTATTTCCTTTGCCCTCGGACG -3' (配列番号 8 6)

#### 【 0 2 4 1 】

ハイグロマイシンB耐性遺伝子を含むプラスミドpGARH (Applied Environ. Microbiol., Vol. 64 (1998) p2676) を鋳型とし、プライマーHGP5とHGP3を用いたPCR ( (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1分) ×20サイクル) を行った。増幅された1.0kbのDNA断片を回収し、TOPO TA Cloning Kitを用いてクローニングした。挿入DNA断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。1.0kbの挿入DNA断片は、SalI-EcoT22II断片として単離し、実施例3で構築したpOMGP4のSalI-EcoT22II間に導入した。得られたプラスミドをpOMHGR1と命名した。得られたプラスミドをHindIII切断、平滑末端処理後、ApaIリンカーを導入した。得られたプラスミドよりハイグロマイシンB耐性遺伝子発現カセットを3.0kbのApaI-KpnI断片として単離し、実施例(21-2)に記載のpOMex1U-N0のApaI-KpnI間に導入した。得られたプラスミドをpOMex5Hと命名した (図18)。

#### 【 0 2 4 2 】

〔実施例22〕 URA3遺伝子を選択マーカーとしたGAP遺伝子プロモーターとターミネーターとを使った異種遺伝子発現プラスミドの構築

実施例3に記載のpOMGP4よりGAP遺伝子プロモーターとターミネーターによる遺伝子発現カセットを2.0kbのHindIII-KpnIとして単離し、実施例(21-2)に記載のpOMUR-XN、及び実施例(21-4)に記載のpOMex4AのHindIII-KpnI間(pOMex4AはpUC19-ADE1を含む断片)に導入した。得られたプラスミドをそれぞれpOMexGP1U、及びpOMexGP4Aと命名した (図18)。

#### 【 0 2 4 3 】

〔実施例23〕 AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによるAspergillus saitoi 由来 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ発現プラスミドの構築

実施例11のようにOgataea minuta  $\Delta$ och1株に、 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを発現させることにより、Man5生産酵母の育種が可能であることが示唆された。そこで、 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを発現するOgataea minuta  $\Delta$ och1株の作成を実施した。発現させる酵素遺伝子として、アスペルギノペプシンI (apnS) のシグナル配

列をアミノ末端に有し、酵母小胞体 (ER) 滞留シグナル (HDEL) をカルボキシ末端に有する Aspergillus saitoi 由来  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子 (J. Biol. Chem., 273 (1998) 26298) を用いた。該遺伝子を含むプラスミド pGAMH1 を鋳型とし、プライマー ; 5'-GGGGGGTCGACATGGTGGTCTTCAGCAAAACCGCTGCCC-3' (配列番号 87)、及び 5'-GGGGGGCGGCCGCGTGATGTTGAGGTTGTTGTACGGAACCCCC-3 (配列番号 88) を用いて、PCR (94°C で 30 秒、50°C で 1 分、72°C で 30 秒)  $\times$  20 サイクルを行った。増幅された  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子の 5' 上流領域の約 0.5kb の DNA 断片を回収し、SalI と NotI で切断した後、pBluescript II SK- の SalI-NotI 間に導入した。挿入 DNA 断片の塩基配列を決定し、正しい塩基配列を有するクローンを選抜した。得られたプラスミドの BglII-NotI 間に、pGAMH1 より単離した  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子内 BglII 部位下流領域の 1.2kb の BglII-NotI 断片を導入した。このプラスミドを paMSN と命名した。paMSN を SalI 切断、平滑末端処理後、XbaI リンカーを導入した。このプラスミドを paMXN と命名した。また一方で paMSN を NotI 切断、平滑末端処理後、BamHI リンカーを導入した。このプラスミドを paMSB と命名した。paMXN を XbaI-ApaI 消化し  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子上流領域を含む 0.4kb の XbaI-BglII 断片を、また paMSB を ApaI-BamHI 消化し  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子下流領域を含む 1.1kb の ApaI-BamHI 断片を単離し、実施例 (21-2) 記載の pOMex1U、及び実施例 (21-3) 記載の pOMex3G の XbaI-BamHI 間に 3 点ライゲーションにより導入した。得られたプラスミドをそれぞれ pOMaM1U、pOMaM3G と命名した。

【0244】

〔実施例 24〕 Aspergillus saitoi 由来  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子発現 Ogataea minuta  $\Delta och1$  株の作成と糖鎖分析

実施例 23 で得られた pOMaM1U を NotI で切断し、実施例 (10-2) で得られた Ogataea minuta TK 3-A 株 (och1  $\Delta$  ura3  $\Delta$ ) を形質転換した。得られた形質転換体の菌体内  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ活性を測定した。BYPM 培地 (0.67% 酵母ニトロゲンベース、1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、100mM リン酸カリウム緩衝液 pH 6.0、0.5% メタノール) で培養した形質転換体を集菌し、1% TritonX100、1mM PMSF の入った 0.1M 酢酸ナトリウム pH 5.0 バッファーに懸濁後、ガラスビーズで菌体を破碎し



、細胞抽出液を得た。これを適宜希釈し、20 pmol量のMan6b糖鎖（宝酒造製）を加え、37度で10分から60分反応させた。反応後煮沸し酵素を失活させた後、HPLCにて生成したMan5糖鎖を分析した。条件は以下の通り。

カラム：TSK-Gel ODS 80TM（6×150mm、東ソー）

カラム温度：50度

流速：1.2ml

溶出条件：A：100mM酢酸アンモニウム pH6.0

B：100mM酢酸アンモニウム pH6.0+0.15%ブタノール

0分 A=70%、12分A=0%の直線濃度勾配

【0245】

最も $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ活性の高かった酵母株を選抜し、該酵母を*Ogataea minuta* TK3-A-MU1株と命名した。該菌株を再度BYPM培地で培養し、細胞表層マンナン蛋白質の糖鎖構造解析を行った。PA化オリゴ糖を調製は実施例1に記載の方法にて行い。HPLCによる分析は実施例11に記載の方法にて行った。

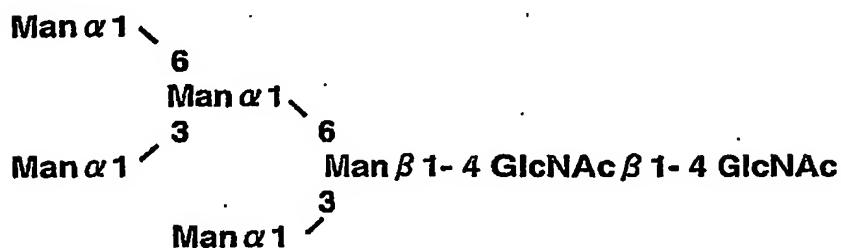
【0246】

その結果を図19に示す。順相カラムによるサイズ分析により、*Ogataea minuta* TK3-A-MU1株はMan5GlcNAc2を主に生成した。また逆相カラムによる構造解析からこのMan5GlcNAc2は下記構造式2の糖鎖を生成しており、これらは混成型・複合型の前駆体であるヒト型のハイマンノース型糖鎖と一致した。

【0247】

【化9】

### 構造式2



【0248】

〔実施例25〕 AOX1遺伝子プロモーターとターミネーターによるSaccharomyces cerevisiae由来インペルターゼ発現プラスミドの構築

Saccharomyces cerevisiae (GenBank登録番号; V01311) のインペルターゼ (SUC2) 遺伝子をPCRによって取得した。Saccharomyces cerevisiae S288C株の染色体DNAを鋳型とし、プライマー; 5'-GGGGACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTG-3' (配列番号89)、及び5'-CCCCAGATCTTATTTTACTTCCCTTACTTGGAAGTTGTC-3' (配列番号90) を用いて、PCR (94℃で30秒、50℃で1分、72℃で1.5分) ×20 サイクル) を行った。増幅された約1.4kbのDNA断片を回収し、SpeIとBglIIで切断した後、実施例(21-2)記載のpOMex1U、及び実施例(21-3)記載のpOMex3GのXbaI-BamHI間に導入した。得られたプラスミドをそれぞれpOMIV1U、pOMIV3Gと命名した。

【0249】

〔実施例26〕 Aspergillus saitoi 由来 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子発現Ogataea minuta OCH1遺伝子破壊株へのSaccharomyces cerevisiae由来インペルターゼ遺伝子の導入、及び発現

実施例25で得られたpOMIV3GをNotIで切断後、実施例24に記載のOgataea minuta TK3-A-MU1株に導入した。形質転換株をBYPM培地 (0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン、100mMリン酸カリウム緩衝液 pH6.0、0.5%メタノール) で培養し、遠心分離によって得られた培養上清について以下の方法でインペルターゼ活性を測定した。すなわち適宜希釈した2 $\mu$ lの培養上清と、200 $\mu$ lの2%ショ糖を含む100mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) を混合した後、37℃で10~30分間インキュベートし、反応液2 $\mu$ lを500 $\mu$ lのグルコーステスト・ワコー (和光純薬) を加え発色させた。インペルターゼによって遊離したグルコースにより発色する吸光度 (505nm) を測定した。最も生産性の高かった酵母株Ogataea minuta TK3-A-MU-IVG1株では約600mg/l培地中にインペルターゼが生産され、培養上清に含まれる蛋白質の大部分を占めていた。

【0250】

〔実施例27〕 実施例26で作成された株が分泌生産するSaccharomyces cerevisi

ae由来インベルターゼの糖鎖構造解析

実施例26で得られたOgataea minuta TK3-A-MU-IVG1株の培養上清をアミコンYM76限外ろ過膜で濃縮、脱塩処理後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（Q-セファロースFF、アマシャムファルマシアバイオテク）に供し、インベルターゼ画分を精製した。この画分を凍結乾燥し実施例1に記載の方法にてPA化N結合型糖鎖を調製した。HPLCによる分析は実施例11に記載の方法にて行った。

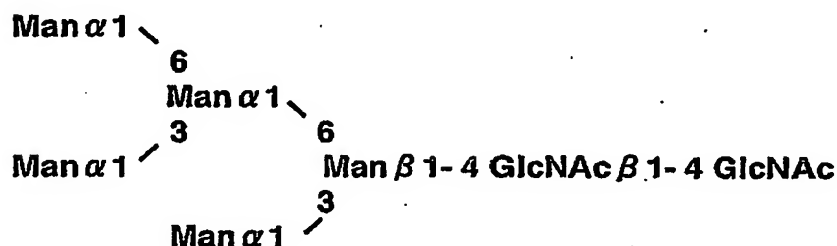
## 【0251】

その結果を図20に示す。アミドカラムによるサイズ分析の結果から、インベルターゼの糖鎖は90%以上Man5GlcNAc2から構成されていることが示された。また逆相カラムによる構造解析からこのMan5GlcNAc2は実施例24に記載の構造式2の糖鎖を生成しており、これらは混成型・複合型の前駆体であるMan5型のハイマンノース型糖鎖と一致した。

## 【0252】

## 【化10】

## 構造式2



## 【0253】

〔実施例28〕 ヒト抗体遺伝子が導入されたOgataea minuta OCH1遺伝子破壊株の育種、該株へのAspergillus saitoi 由来α-1,2マンノシダーゼ遺伝子の導入・発現、及び当該株を用いたヒト抗体の生産

実施例(15-2)で得られたOgataea minuta TK9株 (och1 Δ pep4 Δ prb1 Δ ura3 Δ ade1 Δ) に抗ヒトG-CSF抗体遺伝子を導入した。

## 【0254】

まず抗ヒトG-CSF抗体産生ハイブリドーマの作成は、まずヒトG-CSFを抗原として富塚らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97(2), 722-7(2000)) により、抗ヒトG-CSF抗体産生マウスを作成し、常法 (村松ら編、実験生物学講座、第14巻、p348~364) に従い、脾臓を取り出し、B細胞とマウスミエローマを細胞融合しハイブリドーマを得た。ハイブリドーマからの抗体遺伝子の取得は、Welschhof, Mらの方法 (J. Immunol. Methods. 179(2), 203-14 (1995)) により行った。

# 【 0 2 5 5 】

以上の方法により得られた抗G-CSF軽鎖遺伝子 (配列番号 9 1、コードされるアミノ酸配列を配列番号 9 2 に示す)、及び重鎖遺伝子 (配列番号 9 3、コードされるアミノ酸配列を配列番号 9 4 に示す) のN末端側にXbaIリンカーを、またC末端側にBamHIリンカーを付加し、軽鎖遺伝子を実施例 (21-4) に記載のp0Mex4AのXbaI-BamHIサイトへ、重鎖遺伝子を実施例 (21-3) に記載のp0Mex3GのXbaI-BamHIサイトへそれぞれ導入した。それぞれに作成された発現ベクターをNotI消化後、Ogataea minuta TK9株を順次形質転換した。得られた形質転換体をBYPMG培地 (0.67%酵母ニトロゲンベース、1%酵母エキス、2%ポリペプトン、100mMリン酸カリウム緩衝液 pH6.0、1%メタノール、0.2%グリセロール) で20℃、72時間培養し、遠心分離によって得られた培養上清を用いて、西洋ワサビパーオキシダーゼでラベルされた抗ヒトIgGヒツジ抗体 (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いてウエスタン解析を行った。まず培養上清100 $\mu$ lをマイクロコンYM30にて濃縮し、SDS-PAGEに供した。次に泳動された蛋白をPVDF膜 (イモビロン、ミリポア) にブロッティングし、膜を (ブロックエース、大日本製薬) を用いて1時間ブロッキングした。西洋ワサビパーオキシダーゼでラベルされた抗ヒトIgGヒツジ抗体 (1000倍希釈) を含有するTBS (0.15Mの食塩の入ったトリス緩衝液) 溶液中に1時間インキュベートし、結合しなかった抗体を0.04%ツイーン20を含有するTBSにて洗浄した。シグナルの検出は (スーパーシグナル・ウエストデュラ、ピアス) を用いて行った。その結果、培養上清中に抗体を産生している形質転換体を選択し、Ogataea minuta TK9株由来の抗体生産株を Ogataea minuta TK9-IgB1株と命名した。

## 【 0 2 5 6 】

次にOgataea minuta TK9-IgB1株にAspergillus saitoi由来 $\alpha$ -1,2マンノシダーゼ遺伝子を導入した。実施例 2 3 で作成したプラスミド pOMaM1U を用いて、実施例 2 4 に記載の方法にて、形質転換後、得られた形質転換体より $\alpha$ -1,2マンノシダーゼ発現株の選抜を行った。その結果、得られた株をOgataea minuta TK9-IgB-aM株と命名した。Ogataea minuta TK9-IgB-aM株をBYPMG培地で20℃、72時間培養し、遠心分離によって得られた培養上清を用いてウエスタン解析を行った。その結果を図 2 1 に示すが、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株は、抗体重鎖は一部分解しているものが検出されたが、抗体軽鎖及び重鎖を生産していた。

## 【 0 2 5 7 】

更にOgataea minuta TK9-IgB-aM株の培養上清をアミコンYM76限外ろ過膜で濃縮、脱塩処理後、ProteinAカラムクロマトグラフィー (Hi-Trap ProteinA HP、アマシャムファルマシアバイオテック) に供し、グリシン-塩酸pH3.0にて溶出することにより抗体画分を精製した (図 2 2) 。この抗体が抗原であるG-CSFと結合することを確認するためウエスタン解析を行った。方法は1次抗体として精製された抗体を、2次抗体として西洋ワサビパーオキシダーゼでラベルされた抗ヒトIgGヒツジ抗体を用い、その他は上記に準じて行った。その結果を図 2 3 に示すが、Ogataea minuta TK9-IgB1株が産生した抗体が抗原であるG-CSFと結合することが示された。

## 【 0 2 5 8 】

〔実施例 2 9〕 実施例 2 8 で作成された株が生産するヒト抗体の糖鎖構造解析

実施例 2 8 で示したOgataea minuta TK9-IgB-aM株を用いて生産・精製された抗体、及び同様の方法でOgataea minuta TK9-IgB株より得た抗体を透析後、凍結乾燥し、実施例 1 1 に記載の方法に準じてPA化N結合型糖鎖を調製、順相カラムによるサイズ分析を行った。その結果を図 2 4 に示すが、Ogataea minuta TK9-IgB株の生産する抗体の糖鎖は $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ が主成分であったが、Ogataea minuta TK9-IgB-aM株の生産する抗体の糖鎖は主に $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ であり、哺乳類型のハイマンノース型糖鎖を有することが示された。また、このとき糖鎖の80%以上が $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ から構成されていることが示された。

【 0 2 5 9 】

## 【発明の効果】

本発明による遺伝子工学的手法により新規に育種した糖鎖変異メチロトロフ酵母を用い、ヒトなど哺乳類細胞の生産するハイマンノース型と同一の中性糖鎖、あるいは同一の中性糖鎖を有する糖蛋白質を多量かつ純度よく生産することができる。また更に当該変異株に哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することにより、ハイブリッド型、複合型等の哺乳類型糖鎖、あるいは哺乳類型糖鎖を有する蛋白質を効率的に生産することができる。本発明における酵母株、糖蛋白質は医薬品などに利用することができる。

【 0 2 6 0 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

&lt;120&gt; A methylotrophic yeast capable of producing a mammalian type sugar chain

&lt;130&gt; P02-0194

&lt;160&gt; 94

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

Ala Tyr Met Phe Lys Tyr Asp Ser Thr His Gly

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Asp Gly Pro Ser His Lys Asp Trp Arg Gly Gly

1 5 10

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PGP5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea minuta GAP gene

<400> 3

gcntayatgt tyaartayga ywsnacncay gg

32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PGP3 for amplification of 3'-region of Ogataea minuta GAP gene

<400> 4

ccnccnckcc artcytttrtg nswnggnccr tc

32

<210> 5

<211> 3186

<212> DNA

<213> Ogataea minuta

<220>

<221> CDS

<222> 1492..2502

<400> 5

aagctttact ggttcaaggg gttaagtagg ggCgcggtct ggtctttgtg gttgtttcta 60  
cacggaccac agttgacagc atcgactgct catcgaaaac ggtcgcagtg cggcaatctg 120  
ctctatctaa tcccaggcta ctcgatccct gcacaaccta cagagtgatc cgaccgcact 180  
gcccagagatt cagcagactc tcgcagcgca gcgtgcgttt taatccctca aatcaaggct 240  
gtgcagaccc ggaggatgtg aagctgggac ggCgggaggg aagtctggag tggtagagaga 300  
atgtgggagc tgtgcaaagg ggcaatggtc actcagcgca gagcgatggg ggCgcggggg 360  
ccaatatctc ggcaacaaga acgcccgagg acgacgggac tctgaatgcg agcacgttgt 420



ctttcagaca gtccaccggt attccaatat tcgcaggact cgcgctcaga aacgcaaccc 480  
 cggcagattc gcgtccagtc aggccatctg cggcgagctg ctgcgctcgc gggctgcgcc 540  
 acaacgcata gccacatata cgtcaccgcc cgcccgctgg caacctgagg tttttccgca 600  
 acgggtgcac tgattgctgc gttaacgagg caactggaga tgtcagaggc caagtggagc 660  
 catatcacag cggactgcgc atctctggcc tgccggacgc ggtagcgtcc cgtctttttg 720  
 cggacagctt cttaaaacct ggctgaaact aagcgagacc tgcgacctgg aacgcccgc 780  
 caccggtaca cctccggagt tgtatcctca gaagcggagt aacctgcagg cctacgcaag 840  
 aaaagagccc gggaccatc gaccggaaaa gaggggtgga gctagtgggg tagccttgga 900  
 gcagacctgg ggcagacctg ggttagtacc agggccgaaa agggtcagag gaatcagggt 960  
 ggcacggcag tctataccgt agaagctctt ctcgacagca gcgagcagaa actgcacaga 1020  
 ggtccgttcg ccagtctcgt accaccaccg catgaccaa tcagcattga tgctcccaca 1080  
 tgggtagtgc gcgcgaacgc ctggcaccca aacacaccac ttacgcttcc cgcaccgcgg 1140  
 tggttaacac tggcccggag tagtcatata cggagatfff ggcatgattc taattccggg 1200  
 tcgggacacg acctaagtgg cgtgcaaagc tcgggggcta aatgtttccc ggcgctcgcg 1260  
 gcgactcttg tgcgcgcccg cggcggttcg cgggagacgg gggaaagaga ggggtgaccg 1320  
 cagcgagcga tgggtgtcca gatctcaggc cgagtcaaga caatatataa agagaggatt 1380  
 gtccactttt ctccaatagt atttgaccgg ggttgctctc tgttgatttt ttctagatca 1440  
 tacaattatt gtttgaattc actcaattaa catacaciaa tacaatacaa aatggcttac 1500  
 aacgtcggtta tcaacggatt cggaagaatt ggtagactcg ttcttagaat tgctttgtcc 1560  
 agaaaggaca tcaacgtggt tgccgtgaat gatcattca tcgctgccga gtacgtgtct 1620  
 tacatgttca agtacgactc cactcacgga agataccaag gtgaagtcac cttcgaggga 1680  
 aagtaccttg tgatcgacgg tcagaagatt gaggtgttcc aagagagaga ccctgctgac 1740  
 atcccatggg gtaaggaggg cgttgacttt gtcattgact ccaccggtgt gttcaccacc 1800  
 accgccggcg ctcaaaagca cattgatgct ggtgccaaga aggttatcat cactgctcca 1860  
 tccgtgacg ctccaatgtt cgttatgggt gtcaaccaca aggagtacac caaggacttg 1920  
 tccattgtct ccaacgcttc ctgtaccacc aactgtctgg ctccattggc caaggttgtt 1980  
 aacgacgttt tcggtattga gtctggtttg atgaccaccg tccactctat cactgccacc 2040  
 caaaagaccg ttgacgggtc atcccacaag gactggagag gaggaagaac cgcttccggt 2100  
 aacatcattc catcctccac cgggtccgct aaggctgtcg gtaaggctctt gccagctctt 2160

gctggtaagt tgactggtat gtctctgaga gttcctacca ccgatgttcc cgttggtgac 2220  
 ttgactgtca acttgaagac cccaaccacc tacgcagaga tctccgccgc catcaagaag 2280  
 gcctctgagg gtgaacttgc cggatatctg ggttacactg aggacgccgt tgtctccact 2340  
 gacttcttga ccgacaacag atcttcgac tttgacgcct ctgccggtat cttgttgacc 2400  
 ccaactttcg tcaagttgat ctcttggtac gataacgagt acggttactc caccagagtt 2460  
 gtcgacttgc ttgagcacgt tgccaaggct tcttccgctt aagtggatag atgaccaatg 2520  
 gcctctttaa gtaaacaattt cgttttgaat atatttcaag ttgaataatg aaagccttgt 2580  
 tgtagactta ctccgaagct ccggggcttc ggctccctga atttattttt tacatctctg 2640  
 caccggaaaa ctggctattt gaaaaatttc gacgttttgc ttgaaactcg agttgaggag 2700  
 cattgccaaa ttcgatcggt ttctaacgga cgccagtcga gttattgtta tgtcacgtga 2760  
 catcaattgt cctctattcc tttttggccg atctcgtttg tgctgacggc ctccgaacag 2820  
 ttacttctac cggcagggat tggggatgat cgggatcgat gtctcaact ccagaggctg 2880  
 atccgatgcg gtgggacttc atgcgtccaa atctgttga tgatgtgctc ttctgctttt 2940  
 ttggtgacca aacgagatga caattgactg cattgaaaag gttattagct tttttggtct 3000  
 tctcctgtgt cgattcgagc ggtaccgtag gtaggtctgc tatggaggca tgcgtcataa 3060  
 gtcagccttg attaaacttc ggagctgcgc gatccacatc tctgcaccgc gcggaggcct 3120  
 ttgactgcag cattttaatt aatctcgtaa aataagctct taaacgagat tagcttacgg 3180  
 ggatcc 3186

<210> 6

<211> 336

<212> PRT

<213> Ogataea minuta

<400> 6

Met Ala Tyr Asn Val Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Leu

1

5

10

15

Val Leu Arg Ile Ala Leu Ser Arg Lys Asp Ile Asn Val Val Ala Val

20

25

30

Asn Asp Pro Phe Ile Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys Tyr

35

40

45

Asp Ser Thr His Gly Arg Tyr Gln Gly Glu Val Thr Phe Glu Gly Lys

50

55

60

Tyr Leu Val Ile Asp Gly Gln Lys Ile Glu Val Phe Gln Glu Arg Asp

65

70

75

80

Pro Ala Asp Ile Pro Trp Gly Lys Glu Gly Val Asp Phe Val Ile Asp

85

90

95

Ser Thr Gly Val Phe Thr Thr Thr Ala Gly Ala Gln Lys His Ile Asp

100

105

110

Ala Gly Ala Lys Lys Val Ile Ile Thr Ala Pro Ser Ala Asp Ala Pro

115

120

125

Met Phe Val Met Gly Val Asn His Lys Glu Tyr Thr Lys Asp Leu Ser

130

135

140

Ile Val Ser Asn Ala Ser Cys Thr Thr Asn Cys Leu Ala Pro Leu Ala

145

150

155

160

Lys Val Val Asn Asp Val Phe Gly Ile Glu Ser Gly Leu Met Thr Thr

165

170

175

Val His Ser Ile Thr Ala Thr Gln Lys Thr Val Asp Gly Pro Ser His  
180 185 190

Lys Asp Trp Arg Gly Gly Arg Thr Ala Ser Gly Asn Ile Ile Pro Ser  
195 200 205

Ser Thr Gly Ala Ala Lys Ala Val Gly Lys Val Leu Pro Ala Leu Ala  
210 215 220

Gly Lys Leu Thr Gly Met Ser Leu Arg Val Pro Thr Thr Asp Val Ser  
225 230 235 240

Val Val Asp Leu Thr Val Asn Leu Lys Thr Pro Thr Thr Tyr Ala Glu  
245 250 255

Ile Ser Ala Ala Ile Lys Lys Ala Ser Glu Gly Glu Leu Ala Gly Ile  
260 265 270

Leu Gly Tyr Thr Glu Asp Ala Val Val Ser Thr Asp Phe Leu Thr Asp  
275 280 285

Asn Arg Ser Ser Ile Phe Asp Ala Ser Ala Gly Ile Leu Leu Thr Pro  
290 295 300

Thr Phe Val Lys Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Tyr Gly Tyr Ser  
305 310 315 320

Thr Arg Val Val Asp Leu Leu Glu His Val Ala Lys Val Ser Ser Ala  
325 330 335

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1491

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ogataea minuta*

&lt;400&gt; 7

aagctttact ggttcaaggg gttaagtagg ggcgcggtct ggtctttgtg gttgtttcta 60  
cacggaccac agttgacagc atcgactgct catcgaaaac ggtcgcagtg cggcaatctg 120  
ctctatctaa tcccaggcta ctcgatccct gcacaaccta cagagtgatc cgaccgcact 180  
gcccagagatt cagcagactc tcgcagcgca gcgtgcgttt taatccctca aatcaaggct 240  
gtgcagaccc ggaggatgtg aagctgggac ggcgggaggg aagtctggag tggtagagaga 300  
atgtgggagc tgtgcaaagg ggcaatggtc actcagcgca gagcgatggt ggcgcggggg 360  
ccaatatctc ggcaacaaga acgcccagg acgacgggac tctgaatgcg agcacgttgt 420  
ctttcagaca gtccaccggt attccaatat tcgcaggact cgcgctcaga aacgcaaccc 480  
cggcagattc gcgtccagtc aggccatctg cggcgagctg ctgcgctcgc gggctgcgcc 540  
acaacgcata gccacatata cgtcaccgcc cgcccgtgg caacctgagg ttttccgca 600  
acgggtgcac tgattgctgc gttaacgagg caactggaga tgtcagaggc caagtggagc 660  
catatcacag cggactgcgc atctctggcc tgccggacgc ggtagcgtcc cgtctttttg 720  
cggacagctt cttaaaacct ggctgaaact aagcgagacc tgcgacctgg aacgcccgca 780  
caccggtaca cctccggagt tgtatcctca gaagcggagt aacctgcagg cctacgcaag 840  
aaaagagccc gggacccatc gaccggaaaa gaggggtgga gctagtgggg tagccttgga 900  
gcagacctgg ggcagacctg ggtagtacc agggccgaaa agggtcagag gaatcagggt 960  
ggcacggcag tctataccgt agaagctctt ctcgacagca gcgagcagaa actgcacaga 1020  
ggtccgttcg ccagtctcgt accaccaccg catgaccaa tcagcattga tgctcccaca 1080  
tggttagtgc gcgcgaacgc ctggcaccac aacacaccac ttacgcttcc cgcaccgcgg 1140  
tggttaacac tggcccggag tagtcatata cggagatttt ggcatgattc taattccggg 1200  
tcgggacacg acctaagtgg cgtgcaaagc tcgggggcta aatgtttccc ggcgctcgcg 1260

gcgactcttg tgcgcgcccc cggcggttcg cgggagacgg gggaaagaga ggggtgaccg 1320  
 cagcgagcga tgggtgcca gatctcaggc cgagtcaaga caatatataa agagaggatt 1380  
 gtccactttt ctccaatagt atttgacccg ggttgctctc tgttgatttt ttctagatca 1440  
 tacaattatt gtttgaattc actcaattaa catacacaaa tacaatacaa a 1491

<210> 8

<211> 524

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta*

<400> 8

gtggatagat gaccaatggc ctctttaagt aaacatttcg ttttgaatat atttcaagtt 60  
 gaataatgaa agccttggtg tagacttact ccgaagctcc ggggcttcgg ctccctgaat 120  
 ttatittttta catctctgca ccggaaaact ggctatttga aaaatttcga cgttttgctt 180  
 gaaactcgag ttgaggagca ttgccaaatt cgatcgtttt ctaacggacg ccagtcgagt 240  
 tattgttatg tcacgtgaca tcaattgtcc tctattcctt tttggccgat ctcgtttgtg 300  
 ctgacggcct ccgaacagtt acttctaccg gcagggattg gggatgatcg ggatcgatgt 360  
 cctcaactcc agaggetgat ccgatgcggt gggacttcat gcgtccaaat ctgttgatg 420  
 atgtgctctt ctgctttttt ggtgaccaa cgagatgaca attgactgca ttgaaaaggt 480  
 tattagcttt tttggtcttc tcctgtgtcg attcgagcgg tacc 524

<210> 9

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for production of an expression cassette with GAP gene promoter and terminator from *Ogataea min*

uta

<400> 9

gtttgaattc actcaattaa catacacaaa tacaatacaa agtcgacaaa aaatgcatgt 60  
ggatagatga ccaatggcct cttaagtaa acatttcgtt ttgaatatat ttc 113

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for production of an expression cassette with GAP gene promoter and terminator from Ogataea minuta

<400> 10

ttttactag tacggtaccg ctcgaatcga cacaggag 38

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 11

Gly Pro Tyr Ile Cys Leu Val Lys Thr His Ile Asp

1

5

10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 12

Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys Gly Arg Asp Pro

1

5

10

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PUR5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea Minuta URA3 gene

<400> 13

ggncntaya thtgyytngt naaracncay athga

35

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PUR3 for amplification



of 3'-region of Ogataea Minuta URA3 gene

<400> 14

ggrtcncnknc cyttncrcraa narnccnckn cc

32

<210> 15

<211> 3113

<212> DNA

<213> Ogataea minuta

<220>

<221> CDS

<222> 1732..2529

<400> 15

gccgcggccg ctgctgctgc ttccactaaa acagcaacga gcaacgcgtc tgccgaaaac 60  
tccttgaatc aagacctgga caatcatttg acgttgggca gagagcattt cgacaccact 120  
gaggttcccta ccgcggacgg gtccaaagtg gaggttctcc gaaacatgtc tgtcgagacg 180  
ggtcctgccg acgatcttaa caaaaacccc tccaccagcg agctggtgca tctggaggaa 240  
aaatcacagg aaagcgcatt cgaggaagag gtcaggacct cgaaccatgc cgacacagcc 300  
ggaacagaac caggtccaga acacgtccat ggcaacgata aagcggaggc cgagggcgag 360  
tcctcagaag atgaccagga aatggtggac gtcactgc ctccttcgga cgataaggag 420  
actgagaacg cgctgccgac ggagactaaa gtggagtcga ccaaagacga tgtagaccag 480  
gaagaagagg aagaagagga ggaagaggaa gaaacagtac ctttccaagt ctctaaaaag 540  
gtatccaagg aggaagaaat ttacgtccg acgccggagc ccactacgcc tacgtcggcg 600  
aacgagagcg aggaggaagg cgataccagg ccccggaata ggcggcggtc ggagtcgatt 660  
tcggccgcct ccagcaagag atttttggct cttggtactc aactgttgag ccaagtttcg 720  
tcgaatcggg ttgcgtcgat gtttttgag ccagtgaaca aaaacgagga gcctgagtat 780  
tacaagctca tccaccagcc gatcgatctc aagacgtgt cgaagtcggg ccgaaccggc 840

gagattcagt cgttcgatga ccttgagttc cagctgcaac tcatgttcag caatgcaatc 900  
 atgtacaacg acacctacca gacggaaacg tacaaatgga cgatcgagat gatggaggaa 960  
 gcccagaatc tgattgaaat gttcagggaa acttccaaca actgagatca actgcgacta 1020  
 cttctgttgg ctggctggac gggttgtatt actatcttgg acaacgctat gtaaccttat 1080  
 ctaaatacaa gaattcatgt acaaaatcat ttgtgcgggc gcagagacga gcgacgagtt 1140  
 gccgaaatca cccggctgct cagttaccac ctctcatttg gttcatgagc atttgattct 1200  
 gctcctggaa tctagatccg actctctcac tgtgcttgag gaacttctca gcacacttgt 1260  
 tcaaacaggt ctctctctg gagctgagct tgttgagggt gaagtcattg acacagtcgt 1320  
 tgaaacatct gtcgacaaga ttggtgtaca actggggcaa aataatgta gtcgtggttc 1380  
 atcaaaggct cgacgtcatt ttgctgtctc tagtaactta cccatcatgaa gtcgttcac 1440  
 tgcttctgct cgacgatttt ctggaattcc tgttgttctt tgtagttgag ttgatccatt 1500  
 ttgctgtttt tctagttctg ctttgcctaga ctgttgcca atatctggtt atccctctag 1560  
 cttatcgtgg agaagggtgt ttttttgcta ccaaagctg aaaattctga aaaattttcg 1620  
 gatttgaatt tttttttacc cggcactttt tgaccccata ctagttgtac caaactgaaa 1680  
 gagactgcag ttggtctttg cggggagatt ttggcagata aacaggcgac tatgtcctcg 1740  
 actaagacat acgcgcaaag ggccggcggct catccgtcgc ctgtggccag aagactgctg 1800  
 aacttgatgg aatccaagaa gacgaacttg tgtgcctcgg tcgatctcac ctctacaaag 1860  
 gaccttttgg agctgttggg caagctggga ccgttcattt gtctgggtcaa gacacacatc 1920  
 gacattgtgg aagacttttc gtacgaaaac accgtgggtgc cgctgctgaa actggccaag 1980  
 aaacacaact tcatgatctt cgaggaccga aaatttgccg atataggcaa caccgtcaaa 2040  
 ctccagtaca agggaggagt ttaccaaata gcaaagtggg ccgatatac caacgcccac 2100  
 ggagtgaccg gctcgcgaat tgtctcgggt ctcagacagg ctgccagga gaccaccgac 2160  
 gagccaagag gtctgctcat gctggctgag ctgtcgtctg aaggctcgtc cgcgtacgga 2220  
 gagtacacca aaaagacggt tgaaatcgca aagtccgaca gagattttgt gatcggtttc 2280  
 attgcgcaaa acgacatggg tggccgcgat gagggcttcg actggctcat catgacccca 2340  
 ggtgtcggac tcgacgacac cggtgacgct ctgggccagc agtaccgcac ggtcagcgcc 2400  
 gttatgaaga cgggaactga catcataatc gtgggcaggg gactgttcgg caagggaaga 2460  
 gaccctgtcg tggaaggcga aagatacaga aaggctggat gggacgctta tttgagtcgt 2520  
 gtcgcatgat ttcgggtcac gtgactatat agctatttgt atgtacaaga attaattagc 2580

ggagtttgtc gccaaactct tcggccaact cgatgctcag tttctggcgt gaaatttcga 2640  
 acaccagcag cccgatggag gtagccggtg gacttgttgt tgcagttctc gcgaatcccc 2700  
 tgtagaagaa gccccagtagg gagagatggg acttgcggtg tctggtcatc atgatttcga 2760  
 aagtttcgag gtatgaattg tagtagagct taaagaaacg gcttctctct agatgggtggg 2820  
 cctcgttgta cagatcaagc gactccagtc tggacagatg gaccttctgg attttgttga 2880  
 acggaaattg gattgccagc agggttgttg cggcactggc tccagccaaa agaataaagg 2940  
 tcagccggag agctttgatc gatttcgagt gtttgtccag gtccgggttc ttctctccgt 3000  
 ataacagacg ggctttccag tactggtacc agtttatcat gctctgagtt ctgtggaagc 3060  
 cctggttttt cacaaactca aacacggaga agtagaacgc aaacccaaag ctt 3113

<210> 16

<211> 265

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta*

<400> 16

Met Ser Ser Thr Lys Thr Tyr Ala Gln Arg Ala Ala Ala His Pro Ser

1 5 10 15

Pro Val Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Met Glu Ser Lys Lys Thr Asn

20 25 30

Leu Cys Ala Ser Val Asp Leu Thr Ser Thr Lys Asp Leu Leu Glu Leu

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Gly Pro Phe Ile Cys Leu Val Lys Thr His Ile Asp

50 55 60

Ile Val Glu Asp Phe Ser Tyr Glu Asn Thr Val Val Pro Leu Leu Lys

65

70

75

80

Leu Ala Lys Lys His Asn Phe Met Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala

85

90

95

Asp Ile Gly Asn Thr Val Lys Leu Gln Tyr Lys Gly Gly Val Tyr Gln

100

105

110

Ile Ala Lys Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Ser

115

120

125

Arg Ile Val Ser Gly Leu Arg Gln Ala Ala Gln Glu Thr Thr Asp Glu

130

135

140

Pro Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Glu Gly Ser Leu

145

150

155

160

Ala Tyr Gly Glu Tyr Thr Lys Lys Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp

165

170

175

Arg Asp Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln Asn Asp Met Gly Gly Arg

180

185

190

Asp Glu Gly Phe Asp Trp Leu Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp

195

200

205

Asp Thr Gly Asp Ala Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Ser Ala Val

210

215

220

Met Lys Thr Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly  
225 230 235 240

Lys Gly Arg Asp Pro Val Val Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly  
245 250 255

Trp Asp Ala Tyr Leu Ser Arg Val Ala  
260 265

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplification of a  
gene fragment conferring resistance against chloramphenicol

<400> 17

atggagaaaa aaactagtgg atataccacc

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplification of a

gene fragment conferring resistance against chloramphenicol

<400> 18

ctgagacgaa aaagatatct caataaaccc

30

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DU5 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta URA3 gene

<400> 19

aggaagaaga ggaggaagag gaagaaac

28

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DUC5 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta URA3 gene

<400> 20

cgatgccatt gggatatatc aacggtgg

28

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DU3 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta URA3 gene

<400> 21

ccgtgtttga gtttgtgaaa aaccagggc

29

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DUC3 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta URA3 gene

<400> 22

tgtggcgtgt tacggtgaaa acctggcc

28

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 23

Phe Val Ala Thr Asp Arg Ile Ser Ala Tyr Asp Val Ile Met

1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 24

Gln Asp Ser Tyr Asp Lys Gln Phe Leu Arg Asp Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PAD5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 25

ttygtngcna cngaymgnat hwsngcntay gaygtnatha tg

42

<210> 26

<211> 41



<212> DNA

<213> Artificial Sequence .

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PAD3 for amplification of 3'-region of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 26

gtnarccart cncknarraa ytgyttrtcr tanswrtcyt g

41

<210> 27

<211> 2560

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta*

<220>

<221> CDS

<222> 939..1850

<400> 27

gatatcccaa gaacctatgc cgagggttca gctcacggcc gataaaccaa tcaaagacaa 60  
 cgtttcctga gtttcctcca acggccagga ttatctcgtg agttcccaga ccgttcggct 120  
 tgcgtgtggg cacgaacgag cccacgtaga caaacaggct caaagccaac gaaaactcgt 180  
 acgcagtcac catcaattcc agaaagttct cgtggatgaa cgacagctca ggaaggttga 240  
 actttgtgag ataagctctg ctggcaagaa ttcccacgag aagagtgtct aattctttcc 300  
 cgttgacgag atagttgagc ttgtttccgt ctcgtaacag gactccctct ttatggtagc 360  
 caggcatcac aagatccacc aacgtcagag tgaagaacca caccaggtaa accttcagc 420  
 acgtgacatt taacacaaga tcccgccagt tgccgactat cttggactcg aaaagcgttt 480  
 tcagcgtggc aaaatcgatg cttgcgcctt caaccacata ctctcatta cagcaaaagt 540

agaggaaaag gaccactgaa gggagaaata ctgacaaaac gaccgctccc ggtgtcccgc 600  
 agaaatcttt atgcgtagtc ttggggttca attcagacat ggtagattgg tgagggtaat 660  
 tgtgaagagg attcgataaa gagaggggaa cagcaccgga gatagttctt agatcaaaat 720  
 gtttttctga ctttttttgc tctttctcgt ttagctcgcg tacagtcgac gcgtcggttt 780  
 gcgtcgaaaa gagtcaagcc gcgatcgcg ttaaaaatga atccggagaa gtcaaaaata 840  
 tgtaatttaa accatcacag tatataagta ggcgggaagc gcacaatttc taggcattcc 900  
 acagatcagc taaccaggac attccactgg agccaacaat gtcactcaca acaaccaacc 960  
 tcgacggcat cttgccgcta attgccaaagg gcaaagtcag agacatctat caagttgacg 1020  
 aggaaagcct gctgttcgtg gcaacagacc ggatttccgc ctacgatgtg atcatggaga 1080  
 atggaatcaa agacaagggt aaaatactga ctcagctgtc agtattctgg tttgatttgc 1140  
 tgaaagacac tatcaagaac caccttatcg catccactga cgacgaagtg tttgccagac 1200  
 ttccacagga gctgtctcag ccaaagtaca agtcgcagct gagtggaaga gcactgggtg 1260  
 tgagaaagca caaattgac cccctggagg tgattgtcag aggctacatc accggaagtg 1320  
 catggaagga gtacaacaag agcaagaccg tgcacggctc cgaggttggc gcagagctga 1380  
 aggagagtca agagttcccc gttccgattt tcaccccgtc aacgaaagct gaacaaggcg 1440  
 aacacgacga aaacatttcc cccgagaaag ctgcagagat tgcggggaa caactgtgtg 1500  
 cgcggtctgc agaaaaggct gtgcagctgt actccaaggc cagaacttac gccaaaagca 1560  
 aggttatcat tctcgccgac acaaagtttg agtttggaaat tgacgagaac gacgaattgg 1620  
 ttcttgtgga cgaggttttg acccctgatt cctcgagatt ttgggacgca aagacttaca 1680  
 agatcggaca gtcgcaggac tcttacgaca aacagtttct gagagactgg ctcacgtcca 1740  
 acggtctgaa cgggaaagac ggtgtctcta tgaccgcgga gatcgctgaa cgcacgggtg 1800  
 cgaagtacgt cgaggcattt gagtctctga cgggaagaaa gtggacgtag tttttgataa 1860  
 tagtaaccct ggaaatttga tatgtggcgg ttagtctgtt ggcggtgga taaaatctaa 1920  
 attgaattta gtcgttccc aaaacagcaa tttgtcaaca cttagtctgt gcacagcctt 1980  
 gacggcattt gagccatccc aggttctggc agttacaggc ctttgatcaa aagaaaactg 2040  
 gtgaagtttg acaacaggct acagctgcc aagtcgcaact tgggtagtag ctcattcgtc 2100  
 gaacaccagt gcgccatgtc catcgccaac gagttccagc ccttggagct tatttgtagg 2160  
 ggttcctttg gatgtgttcg gaaagtgcgc cgcaagtcgg acggcaagat atttgtgaga 2220  
 aaggagatct cctacatcgc catgaacacc aaagagaagc agcagctcac agcagagttt 2280

cgtattctca gagaactaaa gcatcccaac attgtccatt atgtccacca cgaccacgtc 2340  
 caggaggaac agaccgtcca tctgtacatg gaatactgcg atgggggcga cttgtcgggtg 2400  
 ttgatcagga agtacaaagg aaagaacgag tttatcccgg agaacttgat ctggcaaadc 2460  
 ttcacccagg ttctcaacgc tctctatcaa tgccactatg gggccaatat tgaggctgtg 2520  
 caagaacttt tccagtccac tccagagatt gcaccccggtg 2560

<210> 28

<211> 303

<212> PRT

<213> Ogataea minuta

<400> 28

Met Ser Leu Thr Thr Thr Asn Leu Asp Gly Ile Leu Pro Leu Ile Ala

1 5 10 15

Lys Gly Lys Val Arg Asp Ile Tyr Gln Val Asp Glu Glu Ser Leu Leu

20 25 30

Phe Val Ala Thr Asp Arg Ile Ser Ala Tyr Asp Val Ile Met Glu Asn

35 40 45

Gly Ile Lys Asp Lys Gly Lys Ile Leu Thr Gln Leu Ser Val Phe Trp

50 55 60

Phe Asp Leu Leu Lys Asp Thr Ile Lys Asn His Leu Ile Ala Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asp Glu Val Phe Ala Arg Leu Pro Gln Glu Leu Ser Gln Pro Lys

85 90 95

Tyr Lys Ser Gln Leu Ser Gly Arg Ala Leu Val Val Arg Lys His Lys

100

105

110

Leu Ile Pro Leu Glu Val Ile Val Arg Gly Tyr Ile Thr Gly Ser Ala

115

120

125

Trp Lys Glu Tyr Asn Lys Ser Lys Thr Val His Gly Leu Glu Val Gly

130

135

140

Ala Glu Leu Lys Glu Ser Gln Glu Phe Pro Val Pro Ile Phe Thr Pro

145

150

155

160

Ser Thr Lys Ala Glu Gln Gly Glu His Asp Glu Asn Ile Ser Pro Glu

165

170

175

Lys Ala Ala Glu Ile Val Gly Glu Gln Leu Cys Ala Arg Leu Ala Glu

180

185

190

Lys Ala Val Gln Leu Tyr Ser Lys Ala Arg Thr Tyr Ala Lys Ser Lys

195

200

205

Gly Ile Ile Leu Ala Asp Thr Lys Phe Glu Phe Gly Ile Asp Glu Asn

210

215

220

Asp Glu Leu Val Leu Val Asp Glu Val Leu Thr Pro Asp Ser Ser Arg

225

230

235

240

Phe Trp Asp Ala Lys Thr Tyr Lys Ile Gly Gln Ser Gln Asp Ser Tyr

245

250

255

Asp Lys Gln Phe Leu Arg Asp Trp Leu Thr Ser Asn Gly Leu Asn Gly

260

265

270

Lys Asp Gly Val Ser Met Thr Ala Glu Ile Ala Glu Arg Thr Gly Ala

275

280

285

Lys Tyr Val Glu Ala Phe Glu Ser Leu Thr Gly Arg Lys Trp Thr

290

295

300

<210> 29

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-primer for amplification of upstream region of URA3 structural gene

<400> 29

ccccgagctc aaaaaaaagg taccaatttc agctccgacg ccggagccca ctacgcctac 60

<210> 30

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3'-primer for amplification of upstream region of URA3 structural gene

<400> 30

gggaagcttc cccagttgta caccaatctt gtcgacag

38

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Dad1-5 used for destruction of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 31

aaaaagcggc cgctcccggg gtcccgacaga aatctttatg cgtagtcttg

50

<210> 32

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Dad1-3 used for destruction of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 32

cccccgatc cttttttta agcttgttgt actccttcca tgcacttccg gtgatg 56

<210> 33

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Dad2-5 used for destruction of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 33

ttttcacccc gtcaaggatc cctgaacaag gcgaacacga cgaaaacatt tcccccgag 59

<210> 34

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer Dad2-3 used for destruction of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 34

tttttgggcc cacctgggtg aagatttgcc agatcaagtt ctcc 44

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DA5 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 35

gatgcttgcg ccttcaacca catactcctc

30

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DA3 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta ADE1 gene

<400> 36

aaaagttctt gcacagcctc aatattgacc

30

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DOU5 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta ADE1 gene



<400> 37

atcgatttcg agtgtttgtc caggtccggg

30

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> variation

<222> 3

<223> Xaa=His or Arg

<220>

<221> variation

<222> 4

<223> Xaa=Ile or Val

<400> 38

Pro Gln Xaa Xaa Trp Gln Thr Trp Lys Val

1

5

10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 39

Trp Tyr Ala Arg Arg Ile Gln Phe Cys Gln Trp

1

5

10

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer POH5 for amplification of 5'-region of Ogataea minuta OCH1 gene

<400> 40

ccncarcryr thtggcarac ntggaargt

29

<210> 41

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer POH3 for amplification of 3'-region of Ogataea minuta OCH1 gene

<400> 41

ccaytgrcar aaytgdatnc knckngcrta cca

33

<210> 42

<211> 2527

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta*

<220>

<221> CDS

<222> 508..1812

<400> 42

agatctgttg acactggtca agcgtgtagc caagagaata ggaaacggaa tttcatactg 60  
ccggcacaca aggacaataa gggcgtccgg ggctgtcgaa attgtcgaga ccgtagagct 120  
attgttacct caataagttg ctctacgatt gtttccgtct ttgacaaagc agtaggcctt 180  
tctcaaggtg gtgtacgggt gtttcatttt taatttgcac cgagaacgcg tagtgcgcca 240  
atggatctgc agggggctcg gctgattgca ctgaaatttc agcaataaat agctgaggat 300  
attcaggcac aacggtacca acggggcagg cttgatcgcg aagcagcagg agaaggcagc 360  
gaagtgactg aagagacgag aaggagacga atcagcctac ccctggaacc ataaacaaag 420  
tcgagccgtt tttttaggga cagaaaccgt tctggatatt tattcgacgc agagactcgg 480  
tagtcatctc tacgttcagc acacaccatg aactatcacg acttgtacga tgatagcaaa 540  
cggcagtcgt tgatgcgaaa ggcgcgaaag ttcgctgaga tgaacaagaa gttggtggtg 600  
gtggtcattt taacgatgta cgttgtgtcg cgtctggcgt cggttgggaag cacgaaacag 660  
gagtcgattc caggactcac catgaaagag tcagagttag aggtgaattt taaaacattt 720  
ggaatggatc tgcagaagcg gaacgagcta ccggccgcaa gtgcaacgct gagagaaaaa 780  
ctatcgtttt acttccccta tgaccctgaa aaaccagtgc ccaaccaa atggcagacg 840  
tgaaagtgg acatcaacga caaatcattc ccgagacact tccgtaagtt ccaagagaca 900  
tggccacaac taaacagcgg gtacacgtac catctcattc cagacagtat tgtggacgag 960  
ttcatgagga gtctttttgc caatgtccct gaggttattg cagcctacaa catgttaccg 1020  
aaaaatatcc tcaaggcgga ttttttccgg tatttggtga tttttgcgcg cgggtggaact 1080  
tattcgata tcgacacgat ctgcctcaaa ccagtgaacg aatgggccac gtttaacgaa 1140

caaactgtca tttcgacta tctcaagacc aacggtaaaa cctcgcagtt gccagaagtg 1200  
 gacccctcca cgcgcaaaac accgatcgga ctcaccattg gaatagaggc cgaccagac 1260  
 agaccgact ggcacgaatg gtacgctaga cgtattcagt tctgtcaatg gacgatccag 1320  
 ggcaagcaag gccatcccat gctgcgcgag ttgatcatcc gtatagtgga gcaaactttc 1380  
 cgcaaagagg ccatgggcaa ttigaaaaaa gtagagggga aggatatggg tggtagacatc 1440  
 atgcagtgga caggaccggg ggttttcaca gataccctgt ttgattatct caataacgtg 1500  
 gtgagtgcg gaaagctggg agacggttac ggagtcgggt ccaagtactg gaacagtcac 1560  
 gccaaagtaca agctgtctca cattgagggt gatgccaaaca acgagccgat gcactctgac 1620  
 aagcaaacta tcagctggaa gtccatgagt aagctatcgg agcccctgat tatagatgac 1680  
 gtgatgatcc tgccaatcac tagcttcagc cccggcgtgg gccagatggg ctgcattcg 1740  
 cccgaccacc cgctcgcat tgtccggcac atgttcagg gcagctggaa accagatgca 1800  
 gagaagatgt gactgcatat aggaacgcat ttatacagt agatcaagtt aaaagtttga 1860  
 acttttgcgg ggaagtgggt taagggtgtt tgacgagggc ctgaaccgt gagtcaacgc 1920  
 gcttggacgg aagaacgggt gcacgccgca tggggctgtt cgttcagttt tgacgctgct 1980  
 aacgagagag tagcttgcag attgcaatcc cgactgagtc caccgggtg agctagtcac 2040  
 acgactgcgt cttttctttc tgggtgtacg gtgtcaatac attttcggtt taaaaacgat 2100  
 aagatgcaac aaggtatctt ctgtagctaa accccacttc tccagacacc ttccaccagc 2160  
 cgatgactat gacagacagg tttttggagg attacaagaa gtttctccc aaagcgcacg 2220  
 atttgagggg cacgcactca cggcttttca cgacggcggg cggggccgat gcggggagtt 2280  
 tggctgattg gagagagtgg acagatgatt tgggtcattc gcaggagtat tacgagctga 2340  
 aacaggagat caattgtctt gttcttaact accttatcta cgaaggatat gttggtgctg 2400  
 ttcgagagtt ttcgaaagag ctgggattcg attttatcgt ggaggagttg gaaggaattg 2460  
 aagaggagaa gggaggccac caagaggacg gagagtacac gaccatgtca gacactgacg 2520  
 tactagt 2527

<210> 43

<211> 434

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta*

<400> 43

Met Asn Tyr His Asp Leu Tyr Asp Asp Ser Lys Arg Gln Ser Leu Met

1 5 10 15

Arg Lys Ala Arg Lys Phe Ala Glu Met Asn Lys Lys Leu Val Val Val

20 25 30

Val Ile Leu Thr Met Tyr Val Val Ser Arg Leu Ala Ser Val Gly Ser

35 40 45

Thr Lys Gln Glu Ser Ile Pro Gly Leu Thr Met Lys Glu Ser Glu Leu

50 55 60

Glu Val Asn Phe Lys Thr Phe Gly Met Asp Leu Gln Lys Arg Asn Glu

65 70 75 80

Leu Pro Ala Ala Ser Ala Thr Leu Arg Glu Lys Leu Ser Phe Tyr Phe

85 90 95

Pro Tyr Asp Pro Glu Lys Pro Val Pro Asn Gln Ile Trp Gln Thr Trp

100 105 110

Lys Val Asp Ile Asn Asp Lys Ser Phe Pro Arg His Phe Arg Lys Phe

115 120 125

Gln Glu Thr Trp Pro Gln Leu Asn Ser Gly Tyr Thr Tyr His Leu Ile

130 135 140

Pro Asp Ser Ile Val Asp Glu Phe Met Arg Ser Leu Phe Ala Asn Val  
145 150 155 160

Pro Glu Val Ile Ala Ala Tyr Asn Met Leu Pro Lys Asn Ile Leu Lys  
165 170 175

Ala Asp Phe Phe Arg Tyr Leu Val Ile Phe Ala Arg Gly Gly Thr Tyr  
180 185 190

Ser Asp Ile Asp Thr Ile Cys Leu Lys Pro Val Asn Glu Trp Ala Thr  
195 200 205

Phe Asn Glu Gln Thr Val Ile Ser His Tyr Leu Lys Thr Asn Gly Lys  
210 215 220

Thr Ser Gln Leu Pro Glu Val Asp Pro Ser Thr Arg Lys Thr Pro Ile  
225 230 235 240

Gly Leu Thr Ile Gly Ile Glu Ala Asp Pro Asp Arg Pro Asp Trp His  
245 250 255

Glu Trp Tyr Ala Arg Arg Ile Gln Phe Cys Gln Trp Thr Ile Gln Gly  
260 265 270

Lys Gln Gly His Pro Met Leu Arg Glu Leu Ile Ile Arg Ile Val Glu  
275 280 285

Gln Thr Phe Arg Lys Glu Ala Met Gly Asn Leu Lys Lys Val Glu Gly  
290 295 300

Lys Asp Met Gly Gly Asp Ile Met Gln Trp Thr Gly Pro Gly Val Phe

305 310 315 320

Thr Asp Thr Leu Phe Asp Tyr Leu Asn Asn Val Val Ser Asp Gly Lys

325 330 335

Leu Gly Asp Gly Tyr Gly Val Gly Ser Lys Tyr Trp Asn Ser His Ala

340 345 350

Lys Tyr Lys Leu Ser His Ile Glu Val Asp Ala Asn Asn Glu Pro Met

355 360 365

His Ser Asp Lys Gln Thr Ile Ser Trp Lys Ser Met Ser Lys Leu Ser

370 375 380

Glu Pro Leu Ile Ile Asp Asp Val Met Ile Leu Pro Ile Thr Ser Phe

385 390 395 400

Ser Pro Gly Val Gly Gln Met Gly Ser His Ser Pro Asp His Pro Leu

405 410 415

Ala Phe Val Arg His Met Phe Gln Gly Ser Trp Lys Pro Asp Ala Glu

420 425 430

Lys Met

<210> 44

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer D03 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta OCH1 gene

<400> 44

ccattgtcag ctccaattct ttgataaacg

30

<210> 45

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer D05 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta OCH1 gene

<400> 45

acacttccgt aagttccaag agacatggcc

30

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer D03-2 used for confirmation of destruction of Ogataea minuta OCH1 gene

<400> 46

tcaccacgtt attgagataa tcaaacaggg

30

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 47

Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Gln Tyr

1

5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 48

Lys Ala Tyr Trp Glu Val Lys Phe

1

5

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PPA5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea minuta PEP4 gene

<400> 49

acnaaytayy tnaaygcnc a rta

23

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PPA3 for amplification  
of 3'-region of Ogataea minuta PEP4 gene

<400> 50

aayttnac y t cccartangc ytt

23

<210> 51

<211> 1951

<212> DNA

<213> Ogataea minuta

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; 491..1720

&lt;400&gt; 51

catatgtatt catcaatcta cagcttttct aatcngtgtg acttcagtca catgatcctc 60  
tgacccgcca cgaccttgct ggcttccagc gcgcgaaact cactcccaat tttcggatta 120  
gctaatacag aagatttttg gatttcctga tctgtagtgt atccatcctg ccttaatcgt 180  
tttcgataca ttgtttatcc gaattgggaa tggcattagt cgtgcgccac ccgactcgcc 240  
acccccattc tagtggcaaa caggattgaa agagggtctaa aaggtaactt agtgttttat 300  
ctctgaatct tccttctgat atcaatcaac aattgttaaa cgattgaaag ttttgaaaca 360  
ttcattgaac ttgcgaagcg ctacacagc atcgttcggt tagcagttac aacagtttag 420  
gtttttttcc ccacaaaag gctcacgctg cctcctcact cttgcctctt ttcttgatga 480  
aactctcgct tgcattgctc gcccttgggtg gttccaaga ggcccacgcc aaggttcatt 540  
atgcgccaat caagaagact cctgccgcgg aaacttaciaa ggacgtgagt ttcggcgact 600  
acgtggattc tctgaagggc aagtatgtct ctatgtttgc taagcatgct gcggagtcct 660  
cccaaaacgc ctttgtccct ttgttcagg aagtgaaga cccagagttt actgttcagg 720  
agggacacaa ctcccctctc acgaactacg tgaacgctca gtacttact gagattcaaa 780  
ttggtacccc gggccaaccg ttcaaggta tcctcgacac tggttcgtcc aatttgtggg 840  
ttccaggctc ggattgttct tctcttgctt gctacctgca tcagaagta gaccacgact 900  
cttcgtcaac ctacaaggcc aacggctctg aatttgctat cagatacggc tctggttcgc 960  
tggagggttt tgtctcccag gacaccctga ctcttgggtga cctcatcatt ccaaagcaag 1020  
actttgccga ggccaccagt gagccaggctc tcgcatttgc ctttggttaag tttgacggta 1080  
ttctcggact tgcgtacgac accatctcgg tggacaagat tgttcctcct atctacaacg 1140  
ctttgaacct ggggcttttg gacgagcctc agttcgctt ctacctcgga gacactgcca 1200  
agtctgaggc agacggtgga gtggctactt tcggagggtg tgacgaaact aagtacgacg 1260  
gaaagatcac ttggttgcca gtgagaagaa aggcttactg ggagggtgaag tttgacggta 1320  
tcgctcttgg tgacgagta gcgactttag acggatatgg cgctgccatc gacacaggta 1380  
cctctttaat tgctttgcct tccaattgg ctgagatttt gaactctcaa atcgggtgccg 1440  
agaagtcctg gtccggccag tacaccattg actgtgaaaa gagagcatct ttgccagacc 1500  
tcactttcaa ctttgacggg tacaatttct ctatctccgc gtacgactac actcttgagg 1560

tticaggctc gtgcatttcc gccttcactc cgatggactt ccctgccccca attggccctc 1620  
 tcgccatcat tggatgatgt ttctgagaa agtattactc cgtgtacgac ttgggcaagg 1680  
 acgctgttgg attggctaag gccgtttaat ctctagcctt ctagttattg attgctattg 1740  
 ttaattctgc catcctggat tggcatgaat ggttggttgg tacgcatata cggttggcgg 1800  
 tggatgttt attgctttta ttacgtgacc aaatgttggt ttttctttca ctttttactc 1860  
 tgcactactt cactctttca ttggctttgg aagtacgtta tttttttcac cctatgtaac 1920  
 tgaattgcac aaatttaaag attgctctag a 1951

<210> 52

<211> 410

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta*

<400> 52

Met Lys Leu Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Gly Gly Phe Gln Glu Ala

1 5 10 15

His Ala Lys Val His His Ala Pro Ile Lys Lys Thr Pro Ala Ala Glu

20 25 30

Thr Tyr Lys Asp Val Ser Phe Gly Asp Tyr Val Asp Ser Leu Lys Gly

35 40 45

Lys Tyr Val Ser Met Phe Ala Lys His Ala Ala Glu Ser Ser Gln Asn

50 55 60

Ala Phe Val Pro Phe Val Gln Glu Val Gln Asp Pro Glu Phe Thr Val

65 70 75 80

Gln Glu Gly His Asn Ser Pro Leu Thr Asn Tyr Val Asn Ala Gln Tyr

85

90

95

Phe Thr Glu Ile Gln Ile Gly Thr Pro Gly Gln Pro Phe Lys Val Ile

100

105

110

Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Gly Ser Asp Cys Ser

115

120

125

Ser Leu Ala Cys Tyr Leu His Gln Lys Tyr Asp His Asp Ser Ser Ser

130

135

140

Thr Tyr Lys Ala Asn Gly Ser Glu Phe Ala Ile Arg Tyr Gly Ser Gly

145

150

155

160

Ser Leu Glu Gly Phe Val Ser Gln Asp Thr Leu Thr Leu Gly Asp Leu

165

170

175

Ile Ile Pro Lys Gln Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu

180

185

190

Ala Phe Ala Phe Gly Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp

195

200

205

Thr Ile Ser Val Asp Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Asn Ala Leu Asn

210

215

220

Leu Gly Leu Leu Asp Glu Pro Gln Phe Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr

225

230

235

240

Ala Lys Ser Glu Ala Asp Gly Gly Val Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp

245

250

255

Glu Thr Lys Tyr Asp Gly Lys Ile Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys

260

265

270

Ala Tyr Trp Glu Val Lys Phe Asp Gly Ile Ala Leu Gly Asp Glu Tyr

275

280

285

Ala Thr Leu Asp Gly Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu

290

295

300

Ile Ala Leu Pro Ser Gln Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ser Gln Ile Gly

305

310

315

320

Ala Glu Lys Ser Trp Ser Gly Gln Tyr Thr Ile Asp Cys Glu Lys Arg

325

330

335

Ala Ser Leu Pro Asp Leu Thr Phe Asn Phe Asp Gly Tyr Asn Phe Ser

340

345

350

Ile Ser Ala Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser

355

360

365

Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Ala Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile

370

375

380

Ile Gly Asp Ala Phe Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly

385

390

395

400

Lys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Ala Val

405

410

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> variation

<222> 2

<223> Xaa=Gly or Leu

<400> 53

Asp Xaa Asn Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly

1

5

10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> variation

<222> 6

<223> Xaa=Ser or Thr

<220>

<221> variation

<222> 9

<223> Xaa=Val or Ile

<220>

<221> variation

<222> 10

<223> Xaa=Ala or Val

<400> 54

Gly Thr Ser Met Ala Xaa Pro His Xaa Xaa Gly

1

5

10

<210> 55

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PPB5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea minuta PRB1 gene

<400> 55

gaybknaayg gncayggnac ncaytgykcn gg

32



<210> 56

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PPB3 for amplification of 3'-region of Ogataea minuta PRB1 gene

<400> 56

ccnrcnayrt gnggnwsngc catnwsngtn cc

32

<210> 57

<211> 2214

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta*

<220>

<221> CDS

<222> 394..2013

<400> 57

ggatcccctc tctcgctagc gagtttcgcc tgctctgcga taagagaaaa ccggctgtgc 60  
agctttcacc ccaacacgtc actttctgca gtcgtgcgcc ggcttgcatt aggtcgtgcg 120  
cagatcccaa atttgccacc agactaaatt ggggcattct ggtgagggaa taggggaaat 180  
aagagggtgt ttgacgttt catatacatt gctctttctt ttcttggacg gttagcggta 240  
ttgccataga ttatcttgcg cagttcagca tccttaggag ttattctttc ttgtaggtct 300  
tttttcagaa cagaaaaatc gccaatcaca gaaagattca gtcctaattg aagccttata 360  
ttatcttata tcacctcaac cacttgaacc aaaatgaagt tatccagtc tgctgcgggtg 420

gctattctgt cttcgttggc agcagtggag gccttgggtca tcccgttatt tgacgacttg 480  
 ccagcagagt ttgcccttgt tccaatggat gcgaaagcgg aagtcatttc tgacgttcct 540  
 gtcgactcgg ccattagtga tgctcctatc gcggcactaa atgatgctcc aagccctctc 600  
 gtcacatcgc tgatcgcac tcaaaatttg attccaaact cttatattgt cgttttcaag 660  
 aatggcctag cttccggggc agttgacttc cacatggagt ggctcaagga aacgcactcc 720  
 caaaccttg ctgctttgtc taaggacatg ccagcagaag aattggccgc cgaaggtttc 780  
 gtttccgaaa gcattgatct tactgagggtg tttagcatct ccgatttggt cagtggatat 840  
 accggatact tcccggagaa ggtggttgac ctcacagaa gacaccctga cgtggcggtc 900  
 gttgagcagg actcgagagt tttcgccgat aagtcgtcta ctcaaacgg tgctccttgg 960  
 ggtttgtcta gaatctctca cagagagcct ctcagtctcg gcaatttcaa cgagtacgtt 1020  
 tacgacgac ttgctggaga tggcgtcacg gcttatgtca ttgataccgg tatcaatgtg 1080  
 aagcacgagc agttcgggtg cagagcagag tggggttaaga ccatcccaac cggatgatgat 1140  
 gatattgacg gaaacggtca cgggtactcac tgcgctggta caattggctc ggaagattat 1200  
 ggagtttcta agaactccaa aattgtcgca gtgaagggtt tgagatctaa cggttctggt 1260  
 tccatgtctg acgtgatcaa ggggtgtgaa ttcgctgcaa atgatcacgt tgccaagtct 1320  
 aaagccaaga aggacggttt caagggatcg actgccaaca tgtctttggg aggtggcaag 1380  
 tctcctgctc ttgacttggc tgtcaatgcc gctgtcaaag ctggtttaca ctttgctgtt 1440  
 gccgctggta acgacaatgc tgacgcatgc aactattctc ctgctgctgc agagaacgca 1500  
 gtcactgttg gtgcgtccac tttgtctgac tctagagctt acttttccaa ctatggtaaa 1560  
 tgtgttgaca tttttgctcc gggcttgaac atcctttcca cctacatagg ttctgacact 1620  
 gccaccgcca ctctttctgg tacatcgatg gcctccctc acgtttgtgg tctgttgacc 1680  
 tactttttga gcttgcaacc agaatcgctg tcgttgtttt cttcggcagc tatctcccct 1740  
 gctcagctga agaagaacct gatcaagttt ggtacgaaga acgttttgtc tgagattcca 1800  
 tcggacggaa ccccaaatat tctcatttac aacggtgctg gcaagaacat cagtgacttc 1860  
 tgggcgtttg aagacgaggc ctcggccaag tccgacttga agaaggctgt cgatattgcc 1920  
 acaagtgttg acttagacct gcaagatata aaggagaagt tcaaccatat tttggaggag 1980  
 gtcgccgaag aggttgctga tttgttcgat taggtttcta acaattcagt gatcttgtct 2040  
 ttactgtggt ttcggaaact gggtttagac agcggtcctg ttactcatat tgcgcttgat 2100  
 cgcttttctt ttttttctg ttgtttggag tgtttgttt tctggataat gtggttagtt 2160

tttcaagttg cttccaatat tgttgtcca gattagagtc attgcttgaa gctt 2214

<210> 58

<211> 539

<212> PRT

<213> Ogataea minuta

<400> 58

Met Lys Leu Ser Gln Ser Ala Ala Val Ala Ile Leu Ser Ser Leu Ala

1 5 10 15

Ala Val Glu Ala Leu Val Ile Pro Leu Phe Asp Asp Leu Pro Ala Glu

20 25 30

Phe Ala Leu Val Pro Met Asp Ala Lys Ala Glu Val Ile Ser Asp Val

35 40 45

Pro Val Asp Ser Ala Ile Ser Asp Ala Pro Ile Ala Ala Leu Asn Asp

50 55 60

Ala Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Leu Ile Ala Ser Gln Asn Leu Ile

65 70 75 80

Pro Asn Ser Tyr Ile Val Val Phe Lys Asn Gly Leu Ala Ser Gly Ala

85 90 95

Val Asp Phe His Met Glu Trp Leu Lys Glu Thr His Ser Gln Thr Leu

100 105 110

Ala Ala Leu Ser Lys Asp Met Pro Ala Glu Glu Leu Ala Ala Glu Gly  
115 120 125

Phe Val Ser Glu Ser Ile Asp Leu Thr Glu Val Phe Ser Ile Ser Asp  
130 135 140

Leu Phe Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Lys Val Val Asp Leu  
145 150 155 160

Ile Arg Arg His Pro Asp Val Ala Phe Val Glu Gln Asp Ser Arg Val  
165 170 175

Phe Ala Asp Lys Ser Ser Thr Gln Asn Gly Ala Pro Trp Gly Leu Ser  
180 185 190

Arg Ile Ser His Arg Glu Pro Leu Ser Leu Gly Asn Phe Asn Glu Tyr  
195 200 205

Val Tyr Asp Asp Leu Ala Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Val Ile Asp  
210 215 220

Thr Gly Ile Asn Val Lys His Glu Gln Phe Gly Gly Arg Ala Glu Trp  
225 230 235 240

Gly Lys Thr Ile Pro Thr Gly Asp Asp Asp Ile Asp Gly Asn Gly His  
245 250 255

Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile Gly Ser Glu Asp Tyr Gly Val Ser  
260 265 270

Lys Asn Ser Lys Ile Val Ala Val Lys Val Leu Arg Ser Asn Gly Ser  
275 280 285

Gly Ser Met Ser Asp Val Ile Lys Gly Val Glu Phe Ala Ala Asn Asp  
290 295 300

His Val Ala Lys Ser Lys Ala Lys Lys Asp Gly Phe Lys Gly Ser Thr  
305 310 315 320

Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly Lys Ser Pro Ala Leu Asp Leu Ala  
325 330 335

Val Asn Ala Ala Val Lys Ala Gly Leu His Phe Ala Val Ala Ala Gly  
340 345 350

Asn Asp Asn Ala Asp Ala Cys Asn Tyr Ser Pro Ala Ala Ala Glu Asn  
355 360 365

Ala Val Thr Val Gly Ala Ser Thr Leu Ser Asp Ser Arg Ala Tyr Phe  
370 375 380

Ser Asn Tyr Gly Lys Cys Val Asp Ile Phe Ala Pro Gly Leu Asn Ile  
385 390 395 400

Leu Ser Thr Tyr Ile Gly Ser Asp Thr Ala Thr Ala Thr Leu Ser Gly  
405 410 415

Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Cys Gly Leu Leu Thr Tyr Phe Leu

420

425

430

Ser Leu Gln Pro Glu Ser Ser Ser Leu Phe Ser Ser Ala Ala Ile Ser

435

440

445

Pro Ala Gln Leu Lys Lys Asn Leu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Asn Val

450

455

460

Leu Ser Glu Ile Pro Ser Asp Gly Thr Pro Asn Ile Leu Ile Tyr Asn

465

470

475

480

Gly Ala Gly Lys Asn Ile Ser Asp Phe Trp Ala Phe Glu Asp Glu Ala

485

490

495

Ser Ala Lys Ser Asp Leu Lys Lys Ala Val Asp Ile Ala Thr Ser Val

500

505

510

Asp Leu Asp Leu Gln Asp Ile Lys Glu Lys Phe Asn His Ile Leu Glu

515

520

525

Glu Val Ala Glu Glu Val Ala Asp Leu Phe Asp

530

535

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> variation

<222> 1

<223> Xaa=His or Asn

<220>

<221> variation

<222> 5

<223> Xaa=Val or Thr

<400> 59

Xaa Tyr Asp Trp Xaa Phe Leu Asn Asp

1

5

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 60

Tyr Asn Leu Cys His Phe Trp Ser Asn Phe Glu Ile

1

5

10

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PKR5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea minuta KTR1 gene

<400> 61

maytaygayt ggrynttyyt naayga

26

<210> 62

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PKR3 for amplification  
of 3'-region of Ogataea minuta KTR1 gene

<400> 62

atytcraft tnsccarar rtgrcanarr ttrta

35

<210> 63

<211> 1930

<212> DNA

<213> Ogataea minuta

<220>

<221> CDS

<222> 124..1335



&lt;400&gt; 63

gagctctata tttagctttg gacatttgta ctagttggac tgttgatcgg ttgacttgac 60  
 agtgagttct atagaaagac aggctacaaa gaccaccaag gctggcaaat ttgcgagatt 120  
 acaatggcta gagcgaatgc gaggctgata cggtttgcaa tctttgctac cgtgttggtt 180  
 ttatgtggat acattttatc caagggctcg tctacttcgt atacgatttc gacgccagag 240  
 tccggctcga gttccagtgg cactgttgct aatactgaga aatctgccct cgcagtgggt 300  
 gagaaaagcg ttgcaggcgc agccgagaaa agcgttcctg cagctgacgt ccagatgga 360  
 aaggtgaagg ccacttttgt ctctttggcc agaaaccagg atctgtggga gctggtgaac 420  
 tcgatcagac aggtcgaaga ccgtttcaac aacaagtatc attacgattg ggtgttcttg 480  
 aacgacgcgg aattcaacga cgagttcaag aaggtgacct ctcaggtctg ttcgggtaag 540  
 accaagtatg gtgtcattcc aaaggaacag tggagcttcc cttcgtggat cgacactgat 600  
 aaggctgctg ccaccagaga gcaaatgaga aaggacaaga tcatctacgg agactccatc 660  
 tcgtacagac acatgtgcag atacgagtcg ggattcttct tcaaacaccc agaactcgca 720  
 gagtacgagt actactggag agtggagcca agcatcaaga tctactgtga cattgactac 780  
 gacatcttca agttcatgaa ggacaacaag aagtcgtacg gatggacatc ttctcttctt 840  
 gagtacaagg agaccatccc aactctgtgg aagaccacta gagacttcat gaaggaaaac 900  
 ccacagtacg ttgcccagga caacctgata aactttattt cggacgacgg aggaagcagc 960  
 tacaatggat gtcacttctg gtctaacttc gaggtcggct cgctcgagtt ctggagaggc 1020  
 gaagcctaca ccaagtactt tgaggcgttg gaccaggctg gtgggttctt ctacgaaaga 1080  
 tggggagatg cccctatcca ctcgattgcc gttgctctgt tcatgcctaa ggacgaggtt 1140  
 catttcttcg acgacgtcgg atacttccac aatccgttcc acaactgccc gatcgacaac 1200  
 gctgtcagag aggccaagaa ctgtgtctgc aaccaagccg acgacttcac cttccagcac 1260  
 tactcctgta cccctaagtt ttaccaggag atgggtttga aaaagcctgc taactgggag 1320  
 cagtacatcc attagttgac ccaggccacg ggttgatttc gcctggttgt tttttgtttt 1380  
 tacaagtctt tcaatactaa attagctgga ttcaagtgat acgagatgat tttcatctcc 1440  
 ggggtttctg taatttttgt ttcgagaaaa ataaatctac aaaaaaacgt gccagatact 1500  
 tgtctcccgg gggcaaaca cgtgctctct ctgctactaa gtgttttggt tctgtccaca 1560  
 acgcccgcag gtaaacgcaa tgtccgatac agattctgag tcagtctcga cgatcacaca 1620  
 gatgagcttc gagaacgttc tcgaggttct agaagactct gcgtctgagt gctccaagaa 1680

caaggacttc ctctccttct cgacgatcat cgacgtccat ctgggtgatc ttccattta 1740  
 cactgagtcc gagcgacttg agctgttgtc gaaactgaca tctattctga gcaatgacca 1800  
 ccaattggtt tacgaggtag gatgggactt accaccgatc atattcagct tcctggactc 1860  
 tgaatcttcg cccagtgagg ggctgatgaa cagcaaggtc acggttcttt tcttgaagct 1920  
 gtttgagctc 1930

<210> 64

<211> 403

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta*

<400> 64

Met Ala Arg Ala Asn Ala Arg Leu Ile Arg Phe Ala Ile Phe Ala Thr

1 5 10 15

Val Leu Val Leu Cys Gly Tyr Ile Leu Ser Lys Gly Ser Ser Thr Ser

20 25 30

Tyr Thr Ile Ser Thr Pro Glu Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Thr Val

35 40 45

Ala Asn Thr Glu Lys Ser Ala Leu Ala Val Gly Glu Lys Ser Val Ala

50 55 60

Gly Ala Ala Glu Lys Ser Val Pro Ala Ala Asp Val Pro Asp Gly Lys

65 70 75 80

Val Lys Ala Thr Phe Val Ser Leu Ala Arg Asn Gln Asp Leu Trp Glu

85 90 95

Leu Val Asn Ser Ile Arg Gln Val Glu Asp Arg Phe Asn Asn Lys Tyr

100

105

110

His Tyr Asp Trp Val Phe Leu Asn Asp Ala Glu Phe Asn Asp Glu Phe

115

120

125

Lys Lys Val Thr Ser Gln Val Cys Ser Gly Lys Thr Lys Tyr Gly Val

130

135

140

Ile Pro Lys Glu Gln Trp Ser Phe Pro Ser Trp Ile Asp Thr Asp Lys

145

150

155

160

Ala Ala Ala Thr Arg Glu Gln Met Arg Lys Asp Lys Ile Ile Tyr Gly

165

170

175

Asp Ser Ile Ser Tyr Arg His Met Cys Arg Tyr Glu Ser Gly Phe Phe

180

185

190

Phe Lys His Pro Glu Leu Ala Glu Tyr Glu Tyr Tyr Trp Arg Val Glu

195

200

205

Pro Ser Ile Lys Ile Tyr Cys Asp Ile Asp Tyr Asp Ile Phe Lys Phe

210

215

220

Met Lys Asp Asn Lys Lys Ser Tyr Gly Trp Thr Ile Ser Leu Pro Glu

225

230

235

240

Tyr Lys Glu Thr Ile Pro Thr Leu Trp Lys Thr Thr Arg Asp Phe Met

245

250

255

Lys Glu Asn Pro Gln Tyr Val Ala Gln Asp Asn Leu Ile Asn Phe Ile

260

265

270

Ser Asp Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gly Cys His Phe Trp Ser Asn

275

280

285

Phe Glu Val Gly Ser Leu Glu Phe Trp Arg Gly Glu Ala Tyr Thr Lys

290

295

300

Tyr Phe Glu Ala Leu Asp Gln Ala Gly Gly Phe Phe Tyr Glu Arg Trp

305

310

315

320

Gly Asp Ala Pro Ile His Ser Ile Ala Val Ala Leu Phe Met Pro Lys

325

330

335

Asp Glu Val His Phe Phe Asp Asp Val Gly Tyr Phe His Asn Pro Phe

340

345

350

His Asn Cys Pro Ile Asp Asn Ala Val Arg Glu Ala Lys Asn Cys Val

355

360

365

Cys Asn Gln Ala Asp Asp Phe Thr Phe Gln His Tyr Ser Cys Thr Pro

370

375

380

Lys Phe Tyr Gln Glu Met Gly Leu Lys Lys Pro Ala Asn Trp Glu Gln

385

390

395

400

Tyr Ile His

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 65

Thr Ser Trp Val Leu Trp Leu Asp Ala Asp

1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 66

Glu Thr Glu Gly Phe Ala Lys Met Ala Lys

1 5 10

<210> 67

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PMN5 for amplification  
of 5'-region of Ogataea minuta MNN9 gene

<400> 67

acnwsntggg tnytntggyt ngaygcnga

29

<210> 68

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PMN3 for amplification  
of 3'-region of Ogataea minuta MNN9 gene

<400> 68

ttngccatyt tngcraance ytcngtytc

29

<210> 69

<211> 2221

<212> DNA

<213> Ogataea minuta

<220>

<221> CDS

<222> 931..2034

<400> 69

gggcccagag gaggaggtag gagtgggggg atcgccaatt ttctggcgcg ctactccgcg 60  
 ctgccccgca cttcgggcgc accgccaacc ttttctttgc gcaccccctc tccaacgttt 120  
 ccggcctttc cattgaagcg agctaagcag tcagagagca ccaccgggag acgtgatcgc 180  
 agcccctgtt tgccccgaaa ccgggttaga caaaacgcgg ttcggttca acggactctc 240  
 atctttcaga tggccgcagg ttgctggcag cttcgggctg acaacatcat ggctgacgta 300  
 ggctagtcag tagggcaccc tgcgggttag taagtctccc tgcaggtcac cgttgcttga 360  
 gcatcgcagg agtggttaagc ggcagaaaag aggaggtgga gtggggacga gagatccggg 420  
 taaccgtagt cggcgcgcga gtccgagaag ttaatcgacg cgtcgaaact gggctctttg 480  
 ttacccaaaa gaagcaggac tggaaggaaa cagaccggga ttggtgtgta ttctgtcag 540  
 ggcacactgg acggtcatcc tagtgtggtt ccgctcaccg cttacctggc tgggtttcct 600  
 ggtccatccc ctagcaaact cgagccggat caccctattc tggccggttt tgctatttcc 660  
 cgcctcgaaa tccccttgaa gtacacagcc tgaaatttgg ctttttcttc actgtcgtgc 720  
 aagacgcaaa acgccttact ttgaacaaca tcaacatcta gcaaatgctg acgaaatttg 780  
 agaaacacaa gagctttacc aacctctaaa aaataacctg ggctcccgtt tgcagctccg 840  
 catctctttc agcaccatta tagaactccg gaaagcatat tcacagcacg tgagacgcgg 900  
 attggctaaa taatcagtgc tgatttggac atgttgaaag gcgttttgaa acaccctctg 960  
 gtacaccaga tacgaaggaa acccgtgaag gtgttggttc ccgtcttcgg attggctgtt 1020  
 ttgttgtttc tgggttttgg aggctcgtct tccaacagaa agaccaacag tccctactcg 1080  
 tacaagcgca acaacagaga tgaggtgatt ccacgtaatt tgccagcgga tcacatctcc 1140  
 cactatgacc tgaacaacct tgcgtcgacg ccgatggctg cttacaacaa ggagagagtg 1200  
 ttgattttga cgccaatggc gaagtttctg gacggatact gggacaactt gctgaaattg 1260  
 acatatccac gtgacctgat cgagctcgga ttcattgtgc cgcgcacagc agaggagagc 1320  
 caagcattga agaagctgga gcacgcggtg aagattatcc agaaccctaaa gaacaccaag 1380  
 gaacctaaagt tcgccaaagt cacgatcctc agacaggaca acgagtcctt ttcgtcacag 1440  
 tcggaaaagg acagacacgc gttcaagggt cagaaagaac ggcgcgcaaa aatggccaca 1500  
 gccagaaact cgctgctgtt caccaccatt ggcccgtaca cctcatgggt tctgtggctt 1560  
 gactcagata tcgtggagtc gcctcacacg ttgatccagg atcttgtttc gcacgacaag 1620  
 ccagtcattg ctgccaattg ctaccagaga tactacgacg aggacaagaa ggaggactcc 1680  
 atccgtcctt acgacttcaa caactggatc gagtctgaag aggagctacg gatcgcaccc 1740

acgatgtcgg acgacgagat catcgtggaa gcgtacgcag aaattgccac ctatcgtcca 1800  
 ctgatgggcc atttctatga tcctaacggc gacctgggaa ccgagatgca actggatggt 1860  
 gtcggaggaa cctgtctgat ggtgaaggcc gacgtccatc gcgacggggc catgttcccg 1920  
 aacttcccct tctaccatct catcgaaacc gaagggttcg ccaaaatggc caaacggctt 1980  
 ggctaccagg tgtttggtct tccaaactat cttgttttcc actacaacga gtgactcttg 2040  
 gtcttttata tagttgagca aaaatgaaaa aacatgtcaa aaatagcaag acaacgtgaa 2100  
 atgtgtcgcg acgcgacgcc gtagttgttg caccgcaacg cgaacttctg tcgcgcctgt 2160  
 caactagaat aggttcgcac acgaccccac cgttccgatt tccttatcag caaagagatc 2220  
 t 2221

<210> 70

<211> 367

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta*

<400> 70

Met Leu Lys Gly Val Leu Lys His Pro Leu Val His Gln Ile Arg Arg

1 5 10 15

Lys Pro Val Lys Val Leu Val Pro Val Phe Gly Leu Ala Val Leu Leu

20 25 30

Phe Leu Val Phe Gly Gly Ser Ser Ser Asn Arg Lys Thr Asn Ser Pro

35 40 45

Tyr Ser Tyr Lys Arg Asn Asn Arg Asp Glu Val Ile Pro Arg Asn Leu

50 55 60

Pro Ala Asp His Ile Ser His Tyr Asp Leu Asn Asn Leu Ala Ser Thr



65	70	75	80
Pro Met Ala Ala Tyr Asn Lys Glu Arg Val Leu Ile Leu Thr Pro Met			
	85	90	95
Ala Lys Phe Leu Asp Gly Tyr Trp Asp Asn Leu Leu Lys Leu Thr Tyr			
	100	105	110
Pro Arg Asp Leu Ile Glu Leu Gly Phe Ile Val Pro Arg Thr Ala Glu			
	115	120	125
Gly Asp Gln Ala Leu Lys Lys Leu Glu His Ala Val Lys Ile Ile Gln			
	130	135	140
Asn Pro Lys Asn Thr Lys Glu Pro Lys Phe Ala Lys Val Thr Ile Leu			
145	150	155	160
Arg Gln Asp Asn Glu Ser Leu Ser Ser Gln Ser Glu Lys Asp Arg His			
	165	170	175
Ala Phe Lys Val Gln Lys Glu Arg Arg Ala Gln Met Ala Thr Ala Arg			
	180	185	190
Asn Ser Leu Leu Phe Thr Thr Ile Gly Pro Tyr Thr Ser Trp Val Leu			
	195	200	205
Trp Leu Asp Ser Asp Ile Val Glu Ser Pro His Thr Leu Ile Gln Asp			
	210	215	220

Leu Val Ser His Asp Lys Pro Val Ile Ala Ala Asn Cys Tyr Gln Arg  
225 230 235 240

Tyr Tyr Asp Glu Asp Lys Lys Glu Asp Ser Ile Arg Pro Tyr Asp Phe  
245 250 255

Asn Asn Trp Ile Glu Ser Glu Glu Gly Leu Arg Ile Ala Ser Thr Met  
260 265 270

Ser Asp Asp Glu Ile Ile Val Glu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Thr Tyr  
275 280 285

Arg Pro Leu Met Gly His Phe Tyr Asp Pro Asn Gly Asp Leu Gly Thr  
290 295 300

Glu Met Gln Leu Asp Gly Val Gly Gly Thr Cys Leu Met Val Lys Ala  
305 310 315 320

Asp Val His Arg Asp Gly Ala Met Phe Pro Asn Phe Pro Phe Tyr His  
325 330 335

Leu Ile Glu Thr Glu Gly Phe Ala Lys Met Ala Lys Arg Leu Gly Tyr  
340 345 350

Gln Val Phe Gly Leu Pro Asn Tyr Leu Val Phe His Tyr Asn Glu  
355 360 365

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DMN5

<400> 71

agatgaggtg attccacgta atttgccagc

30

<210> 72

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer DMN3

<400> 72

ttttgattgt catctatttc gcacaccctg

30

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 73

Gly Gly Gly Ser Ser Ile Asn Phe Met Met Tyr Thr

1

5

10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> *Pichia pastoris*

<400> 74

Asp Met Trp Pro Met Val Trp Ala Tyr Lys

1

5

10

<210> 75

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer PAX5 for amplification of 5'-region of Ogataea minuta AOX1 gene

<400> 75

ggnggnggnw snwsnathaa yttyatgatg tayac

35

<210> 76

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: primer PAX3 for amplification  
of 3'-region of Ogataea minuta AOX1 gene

&lt;400&gt; 76

ttrtangccc anaccatngg ccacatrtc

29

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 5817

&lt;212&gt; DNA

<213> Ogataea minuta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 2349..4340

&lt;400&gt; 77

aagctttctt tcgcaaacag ctcttttgta gaggagaata gagtgccag ctgataaaga 60  
aggcgcactt taaaagataa tctacatcca gaaaaataaa aaaataaaac tgaaccggca 120  
tttgcgatta cgtaagccac aaaatttcag gaaactcgta caagatcagg ttggcgaggg 180  
ggctagcgat agaatgtatc agtggtatta gtggctctag gagtagaaaa caatagaata 240  
aagatccgaa gaaagggagc aagaaggcca cgccagacgt tctagtaggt agcccaatcg 300  
tcaatgtagc tggtcaggtc tttcaacagg ttcttggtct cgtctggact ggagatccaa 360  
caagtcgttg ctgcggttcg actggcatag tcgttggcgc cgagggagct gaactggtcg 420  
ccgacgtgca ggggtgtttc gggcttgatg gttcggttgt cgttgcagct gaggaactct 480  
tggaggattt tcaccccgta ggacttgctg ccaatatcga ccagatgtc cgagcctccg 540  
ttgaaagcgc accatctgat tttcttagag gaaggggaagt ggcgagagacg tttgtctacg 600  
cgcagaacca cctcttcag ctgctcgca acgagtttgt agccttcttt ggggaccagt 660  
ccaacggcac gtcctttct gatgatgatg gcatgcaatg aaagtttctt gatcaggtcc 720

gagaagatct cctgcgcaaa gtccagggtc cggatgatgt cttcctcgga ccagtcgagc 780  
 atgttttcaa gcagccattt gtctttggag aagaactcga gtccgccaag ctcgttggag 840  
 tagcgggaata ggtagtttgc ttcgcctccc atcaccagaa cgttctggcg ctgtctgtcg 900  
 gtgagctttg gggtagtctt cacctcgtct atgagccccct tgagtcgggc gtagtacttg 960  
 gagccgtcgg agtagccgc ggagtgacg atgccgacat agaggtcttt ggcgagcagc 1020  
 ttgatgagat ggggcaagat cggcgacgag gcgtcgaagt tggagccgtc atcgtagaga 1080  
 gtgatgtctc cgtcaaaagt cacgagctgg agtctgcggt gtacggatgt tttgttgtgg 1140  
 aaagtgttgg agagctcgag aagtgcgcc gtgttcagaa tgagccgaat gtcgttgaac 1200  
 gagggcgcta caagtctct tttgtgatt gtgcggcgtc cgtcctcgat gtagaacgcc 1260  
 ttctccagg gcaatcgggt gaagaaacag ccaacggaag gcaccaattg gaccaatctg 1320  
 gacatttcag gcattccgc ctgggtcatc tcgatgttgt cgttgatcag cagctcgagg 1380  
 tcatggaaga tttcccgta gcgtcgcttc gcttccgaat tcacatgag gtcgtccact 1440  
 gcggagatcc cattggactt gactgcatag agaacaacg gggtagccag caagcccttg 1500  
 atccactcaa tcagtccgtc tcggcggtgc tccttgagcg cgtactcgac tctgtatctg 1560  
 gttgtcattt gcgggagggg tgtaaagcag ctcagccggt gactgtgcaa ggacgaacgg 1620  
 ttcctacttg aatgctaggc tggctaattg ggtatggcac aaacggcaca aacggcagat 1680  
 gactgcaaat gacgacgta aacagaatcc actcagctgg cactaactgg gtgtagacta 1740  
 agagttcgag ccggggaggg agtgacgatg cagccagaaa aagagccggt acgcaatcag 1800  
 ggaaatagcc gtcaaaagaa aaacagaagg ggctgcagtt ttgctgccgc ccgccgcgcg 1860  
 cccgcgctgg ctttccccgg ccggggaggc agccggctaa agaaaatagc ctatttcgat 1920  
 ttcgcgtagc ccctcggtt cctattgagg gttacttttc gctccctctt ttgggccaac 1980  
 tgacagtttg tgggtaaca acggtgtccg aggccagcta ttcggcaaac aatagacaga 2040  
 ttagagacct actacggagt ttcagtgtct tcggaagctg cacagcccga atgtcggagc 2100  
 ccgtgtgacg acacccccgc atggcttttg gcaatctcac atgccccctc cctgcgtctc 2160  
 cactctgggc atgagcagt gtgtgcctgg tgtatctctg gccccgcgg ggcagacagc 2220  
 aaactgcgta taaatagcta ctccatctc ctacttgttg caccattgcc atagtaagaa 2280  
 aagaagcaga tcactcaact tgttcaaaga ctcttgtgtt ctgttacgac ttacgactta 2340  
 cgaaaaaat ggctattcct gacgaattcg atatcatcgt tgtgggtgga ggctcatgcg 2400  
 gctgcgccat cgccggtaga ctcggttaacc tcgaccgga cgttactgtg gctctcatcg 2460

aggggtgggtga gaacaacatc aataacccat ggggtctacct tcctgggtgtc tatccaagaa 2520  
 acatgagact cgactccaag acggctacct tctacaactc gagaccatcc aagcacctga 2580  
 acggcagaag ggccattgtc ccctgcgcta acattcttgg tggagggttcc tccatcaact 2640  
 tcctcatgta caccagagcc tcggcctccg actacgacga ctgggagcaa gagggatgga 2700  
 ccaccgacga gctgcttccg ctcatgaaga agctcgagac gtatcaacgt ccttgcaaca 2760  
 acaggagggt gcacggtttc gacgggtccga tcaagggtctc cttcggtaac tacacctacc 2820  
 caactgcccga agacttcctg agagcctgcg agtcgcaggg tattcctttc aacgacgac 2880  
 ttgaagacct caaggcctcg cacggagctg agtactggct caagtggatc aacagggatc 2940  
 tcggtagaag atcggactcg gcacacgcct acatccaccc taccatgaga aacaagagca 3000  
 atctgttcct cattacgtcc accaaggctg acaaggatgat cattgagaac ggcgttgctg 3060  
 tcggtgtcag gaccgttcca atgaagccgg tcgagaccaa aaacctcca agcaggatct 3120  
 tcaaggccag aaagcaaatt gtggtttcgt gcggtacgat ctctctcca ttggtgctgc 3180  
 aaagatctgg tatcggtgcg gccacaagc tgagacaagc gggcatcaag ccgatcgtcg 3240  
 acttgcctgg tgtcggtgag aacttccagg accactactg cttcttcacc ccatactatt 3300  
 ccaagccaga ggttccaacc tttgacgact ttgtcagagg tgaccagtc gctcaaaagt 3360  
 ccgcctttga ccagtgttac tccaacaagg acggtcctct taccaccaac ggtatcgagg 3420  
 ctggtgtcaa gatcagacca accgacgagg agttggccac ggctgacgat gacttcatcc 3480  
 aagggtacca cgagtacttt gacaacaagc cagacaagcc actgatgcat tactctgtca 3540  
 tttccggttt cttcggtgac cacaccaaga ttccaaacgg caagttcttc accatgttcc 3600  
 actttttgga gtacctattt tcgagagggt tcgtttatgc tgtttcccca gaccatacg 3660  
 aagctccaga ctttgatcca ggtttcctga acgattccag agacatgtgg cctatggttt 3720  
 ggtcttataa gaagtcgaga cagacagcca gaagaatgga gtcgtttgct ggtgaagtca 3780  
 cctcgcacca cccactctac ccggttgact ctccagcccg tgccaaggac ttggatctcg 3840  
 agacatgcaa ggcatittgt ggaccaaacc acttcaccgc caacttgtag cacggttcct 3900  
 ggactgttcc aattgagaag ccaacgcaa agaacgactc gcacgtgacc tgcaaccagg 3960  
 tcgagatctt ctccgacatt gactactctg ccgaggacga tgaggctatt gtcaagtaca 4020  
 tcaaggagca cactgagacc acctggcact gtttggaac ctgttcgatg gctccacaag 4080  
 aaggtagcaa gatcgctcca aagggtgggtg ttgtcgatgc cagattgaac gtgtacgaag 4140  
 tgaagaacct caaggttgcc gacctgtcga tctgccaga taacgttgga tgtaatactt 4200

actccactgc tcttctgatt ggtgagaagg ctgccacttt ggtcgccgag gacctgggat 4260  
 actcaggatc tgatctcgcc atgaccattc caaacttcaa gctaggtact tacgaggaga 4320  
 agggctctggc tagattctaa gagacgggtgc cggactcttg ttcaattctt ttggttcttt 4380  
 ttctgttttt ctctacgatt ctacttgatg atgtatgacg agtgaagatt gtgttttttt 4440  
 ctctctatag ttttgactgt aatgaaaata gtctacatga atgaaagaga tagctgacca 4500  
 atacggggcg tctggtcacg tgatgtatca cgtgatcttt aagttttcga aatgactaaa 4560  
 ttataacga aaaaaagagt ctaaataaaa aaaaatcgat ctctgcaaaa gactcatcga 4620  
 taggctaact caggaagcat tccgagcaac gcataatgcc ctcaaccaca gtctcagaga 4680  
 tgcgcaaaaa ggtgctgatg atcgacaatt acgactcggt cacatggaac ttgtacgagt 4740  
 atctttgtca agaggggagcc gatgtcgagg tctatcgtaa cgacaagatc acaattgaag 4800  
 aaatcgagga aatgaagcct gacattatag tgatttcgcc aggccccgga catccgagat 4860  
 cggactctgg tatctctcga aagactattg agattttcaa gggccggatt cctgtttttg 4920  
 gagtgtgcat gggccaacag tgcatttacg aggttttcgg gggagacgtt gagtacgctg 4980  
 gtgaaattgt tcacggaaaa acctcttctg tgaccacaga caatcgtgga gtcttcaaga 5040  
 acgttccgca gggagttgct gtgacgagat accattcggt ggctggaacg ctaaaaactt 5100  
 tgcccagcga gttggaggtg actgcccgtc ccactaacgg tatcattatg ggtgtcaggc 5160  
 ataaaagata cactattgaa ggcgttcagt ttcacccgga gtccattttg acagaagagg 5220  
 ggcacttaat gatcaagaac attttgaaga gtagcgggtg ttactggaac gaggaggagg 5280  
 aggaggtaaa acaaggcggt gccagaagg agtcgatttt agacaagatt tacggcgaga 5340  
 gaaaaaaggc gtacgaagag attgaaaaac agccaggtcg ctggtttgcc gatttgagg 5400  
 cctatttgga gctatgtggt gcccagacg ttttgaactt ctacgaccgg ttaaatagaga 5460  
 acgtcaagca aggaaagcct gccattttga gtgaaatcaa gagagcctcg ccttcgaaag 5520  
 gggctattca gatgggtgcc aatgctgcaa aacaggcgta cacctatgcc acggcggggg 5580  
 ttctggctat atccgttttg acagagccaa actggttcaa aggaacgatt gaggatttac 5640  
 gagggtgcgc tcagacggtt ggaaaactcc aacaccgtcc gtgcattttg cgcaaggagt 5700  
 ttgtcttttg caagtaccag attctggagg ccagactggc gggcgagac actgttttgc 5760  
 tgattgtcaa gatgctttca ggagctgagt tgcgcgaact ggttggctat tcccggg 5817



<211> 663

<212> PRT

<213> *Ogataea minuta*

<400> 78

Met Ala Ile Pro Asp Glu Phe Asp Ile Ile Val Val Gly Gly Gly Ser

1                      5                                  10                                  15

Cys Gly Cys Ala Ile Ala Gly Arg Leu Gly Asn Leu Asp Pro Asp Val

20                                  25                                  30

Thr Val Ala Leu Ile Glu Gly Gly Glu Asn Asn Ile Asn Asn Pro Trp

35                                  40                                  45

Val Tyr Leu Pro Gly Val Tyr Pro Arg Asn Met Arg Leu Asp Ser Lys

50                                  55                                  60

Thr Ala Thr Phe Tyr Asn Ser Arg Pro Ser Lys His Leu Asn Gly Arg

65                                  70                                  75                                  80

Arg Ala Ile Val Pro Cys Ala Asn Ile Leu Gly Gly Gly Ser Ser Ile

85                                  90                                  95

Asn Phe Leu Met Tyr Thr Arg Ala Ser Ala Ser Asp Tyr Asp Asp Trp

100                                  105                                  110

Glu Gln Glu Gly Trp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Pro Leu Met Lys Lys

115                                  120                                  125

Leu Glu Thr Tyr Gln Arg Pro Cys Asn Asn Arg Glu Val His Gly Phe  
130 135 140

Asp Gly Pro Ile Lys Val Ser Phe Gly Asn Tyr Thr Tyr Pro Thr Ala  
145 150 155 160

Gln Asp Phe Leu Arg Ala Cys Glu Ser Gln Gly Ile Pro Phe Asn Asp  
165 170 175

Asp Leu Glu Asp Leu Lys Ala Ser His Gly Ala Glu Tyr Trp Leu Lys  
180 185 190

Trp Ile Asn Arg Asp Leu Gly Arg Arg Ser Asp Ser Ala His Ala Tyr  
195 200 205

Ile His Pro Thr Met Arg Asn Lys Ser Asn Leu Phe Leu Ile Thr Ser  
210 215 220

Thr Lys Ala Asp Lys Val Ile Ile Glu Asn Gly Val Ala Val Gly Val  
225 230 235 240

Arg Thr Val Pro Met Lys Pro Val Glu Thr Lys Asn Pro Pro Ser Arg  
245 250 255

Ile Phe Lys Ala Arg Lys Gln Ile Val Val Ser Cys Gly Thr Ile Ser  
260 265 270

Ser Pro Leu Val Leu Gln Arg Ser Gly Ile Gly Ala Ala His Lys Leu  
275 280 285

Arg Gln Ala Gly Ile Lys Pro Ile Val Asp Leu Pro Gly Val Gly Glu

290

295

300

Asn Phe Gln Asp His Tyr Cys Phe Phe Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro

305

310

315

320

Glu Val Pro Thr Phe Asp Asp Phe Val Arg Gly Asp Pro Val Ala Gln

325

330

335

Lys Ser Ala Phe Asp Gln Trp Tyr Ser Asn Lys Asp Gly Pro Leu Thr

340

345

350

Thr Asn Gly Ile Glu Ala Gly Val Lys Ile Arg Pro Thr Asp Glu Glu

355

360

365

Leu Ala Thr Ala Asp Asp Asp Phe Ile Gln Gly Tyr His Glu Tyr Phe

370

375

380

Asp Asn Lys Pro Asp Lys Pro Leu Met His Tyr Ser Val Ile Ser Gly

385

390

395

400

Phe Phe Gly Asp His Thr Lys Ile Pro Asn Gly Lys Phe Phe Thr Met

405

410

415

Phe His Phe Leu Glu Tyr Pro Phe Ser Arg Gly Phe Val Tyr Ala Val

420

425

430

Ser Pro Asp Pro Tyr Glu Ala Pro Asp Phe Asp Pro Gly Phe Leu Asn

435

440

445

Asp Ser Arg Asp Met Trp Pro Met Val Trp Ser Tyr Lys Lys Ser Arg

450

455

460

Gln Thr Ala Arg Arg Met Glu Ser Phe Ala Gly Glu Val Thr Ser His

465

470

475

480

His Pro Leu Tyr Pro Val Asp Ser Pro Ala Arg Ala Lys Asp Leu Asp

485

490

495

Leu Glu Thr Cys Lys Ala Phe Ala Gly Pro Asn His Phe Thr Ala Asn

500

505

510

Leu Tyr His Gly Ser Trp Thr Val Pro Ile Glu Lys Pro Thr Pro Lys

515

520

525

Asn Asp Ser His Val Thr Cys Asn Gln Val Glu Ile Phe Ser Asp Ile

530

535

540

Asp Tyr Ser Ala Glu Asp Asp Glu Ala Ile Val Lys Tyr Ile Lys Glu

545

550

555

560

His Thr Glu Thr Thr Trp His Cys Leu Gly Thr Cys Ser Met Ala Pro

565

570

575

Gln Glu Gly Ser Lys Ile Ala Pro Lys Gly Gly Val Val Asp Ala Arg

580

585

590

Leu Asn Val Tyr Glu Val Lys Asn Leu Lys Val Ala Asp Leu Ser Ile

595

600

605

Cys Pro Asp Asn Val Gly Cys Asn Thr Tyr Ser Thr Ala Leu Leu Ile

610

615

620

Gly Glu Lys Ala Ala Thr Leu Val Ala Glu Asp Leu Gly Tyr Ser Gly

625

630

635

640

Ser Asp Leu Ala Met Thr Ile Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Tyr Glu

645

650

655

Glu Lys Gly Leu Ala Arg Phe

660

<210> 79

<211> 2348

<212> DNA

<213> *Ogataea minuta*

<400> 79

aagcttttctt tcgcaaacag ctcttttggtg gaggagaata gagtgccccag ctgataaaga 60  
 aggcgcactt taaaagataa tctacatcca gaaaaataaa aaaataaaac tgaaccggca 120  
 tttgcgatta cgtaagccac aaaatttcag gaaactcgta caagatcagg ttggcgaggg 180  
 ggctagcgat agaattgtatc agtgttatta gtggctctag gagtagaaaa caatagaata 240  
 aagatccgaa gaaagggagc aagaaggcca cgccagacgt tctagtaggt agcccaatcg 300  
 tcaatgtagc tggtcaggtc tttcaacagg ttcttggtct cgtctggact ggagatccaa 360  
 caagtcgttg ctgcggttcg actggcatag tcgttggcgc cgaggagct gaactggctg 420

ccgacgtgca ggggtgttttc gggcttgatg gttcggttgt cgttgcagct gaggaactct 480  
 tggaggattt tcaccccgta ggacttgtcg ccaatatcga cccagatgtc cgagcctccg 540  
 ttgaaagcgc accatctgat tttcttagag gaagggaagt ggCggagacg tttgtctacg 600  
 cgcagaacca cctcttccag ctgctcgCga acgagtttgt agccttcttt ggggaccagt 660  
 ccaacggcac gtccttttct gatgatgatg gcatgcaatg aaagtttctt gatcagggtcc 720  
 gagaagatct cctgcgcaaa gtccagggtc cggatgatgt cttcctcgga ccagtcgagc 780  
 atgttttcaa gcagccattt gtctttggag aagaactcga gtccgccaag ctcgttggag 840  
 tagcggaata ggtagtittgc ttcgcctccc atcaccagaa cgttctggcg ctgtctgtcg 900  
 gtgagctttg ggggtggtctt cacctcgtct atgagccctt tgagtcgggc gtagtacttg 960  
 gagccgtcgg agtagcccgC ggCagtgcg atgccgacat agaggtcttt ggCgagcagc 1020  
 ttgatgagat ggggcaagat cggcgacgag gcgtcgaagt tggagccgtc atcgtagaga 1080  
 gtgatgtctc cgtcaaaagt cacgagctgg agtctgcggt gtacggatgt tttgttgtgg 1140  
 aaagtgttgg agagctcgag aagttgcgc gtgttcagaa tgagccgaat gtcgttgaac 1200  
 gagggcgcta caagtctcct tttgctgatt gtgcggcgtc cgtcctcgat gtagaacgcc 1260  
 ttctccaggg gcaatcgggt gaagaaacag ccaacggaag gcaccaattg gaccaatctg 1320  
 gacatttcag gcattcccgC ctgggtcatc tcgatgttgt cgttgatcag cagctcgagg 1380  
 tcatggaaga tttcccgta gcgtcgcttc gcttccgaat tcacatgag gtcgtccact 1440  
 gcggagatcc cattggactt gactgcatag agaacaaacg ggggtggccag caagcccttg 1500  
 atccactcaa tcagtccgtc tcggcggtgc tccttgagcg cgtactcgac tctgtatctg 1560  
 gttgtcattt gcgggagggg tgtaaagcag ctCagccggt gactgtgcaa ggacgaacgg 1620  
 ttctacttg aatgctaggc tggctaattg ggtatggcac aaacggcaca aacggcagat 1680  
 gactgcaaat gacgacggta aacagaatcc actcagctgg cactaactgg gtgtagacta 1740  
 agagttcgag ccggggaggg agtgacgatg cagccagaaa aagagccggt acgcaatcag 1800  
 ggaaatagcc gtcaaaagaa aaacagaagg ggctgcagtt ttgctgccgc ccgccgcgcg 1860  
 cccgcgctgg ctttccccgg ccggggaggc agccggctaa agaaaatagc ctatttcgat 1920  
 ttcgcgtagc ccctcggttg cctattgagg gttacttttc gctccctctt ttgggccaac 1980  
 tgacagtttg tgggtaaca acggtgtccg aggccagcta ttcggcaaac aatagacaga 2040  
 ttagagacct actacggagt ttcagtgtct tcggaagctg cacagcccga atgtcggagc 2100  
 ccgtgtgacg acacccccgc atggcttttg gcaatctcac atcggccctc cctgcgtctc 2160

cactctgggc atgagcagtg gtgtgcctgg tgtatctctg gccccgcgg ggcagacagc 2220  
 aaactgcgta taaatagcta cttccatctc ctacttggtg caccattgcc atagtaagaa 2280  
 aagaagcaga tcactcaact tgttcaaaga ctcttggtgt ctgttacgac ttacgactta 2340  
 cgaaaaaa 2348

<210> 80

<211> 802

<212> DNA

<213> Ogataea minuta

<400> 80

gagacggtgc ccgactcttg ttcaattctt ttggttcttt ttctgttttt ctctacgatt 60  
 ctacttgatg atgtatgacg agtgaagatt gtgttttttt ctctctatag ttttgactgt 120  
 aatgaaaata gtctacatga atgaaagaga tagctgacca atacggggcg tctggtcacg 180  
 tgatgtatca cgtgatcttt aagttttcga aatgactaaa tttataacga aaaaaagagt 240  
 ctaaatgaaa aaaaatcgat ctctgccaaa gactcatcga taggctaact caggaagcat 300  
 tccgagcaac gcataatgcc ctcaaccaca gtctcagaga tgcgcaaaaa ggtgctgatg 360  
 atcgacaatt acgactcgtt cacatggaac ttgtacgagt atctttgtca agagggagcc 420  
 gatgtcgagg tctatcgtaa cgacaagatc acaattgaag aaatcgagga aatgaagcct 480  
 gacattatag tgatttcgcc aggcccgga catccgagat cggactctgg tatctctcga 540  
 aagactattg agattttcaa gggccggatt cctgtttttg gagtgtgcat gggccaacag 600  
 tgcatttacg aggttttcgg gggagacgtt gagtacgctg gtgaaattgt tcacggaaaa 660  
 acctcttctg tgaccacga caatcgtgga gtcttcaaga acgttccgca gggagttgct 720  
 gtgacgagat accattcgtt ggctggaacg ctaaaaactt tgcccagcga gttggaggtg 780  
 actgcccgta ccactaacgg ta 802

<210> 81

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer OAP5 for production of an expression cassette with AOX1 gene promoter and terminator

<400> 81

ctgcagcccc ttctgttttt cttttgacgg

30

<210> 82

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer OAP3 for production of an expression cassette with AOX1 gene promoter and terminator

<400> 82

cccccgatc caggaacccg ggaacagaat ctagattttt tcgtaagtcg taagtcgtaa 60

cagaacacaa gagtctttga acaagttgag

90

<210> 83

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer OAT5 for production of



an expression cassette with AOX1 gene promoter and terminator

<400> 83

cccccccgga tccgagacgg tgcccgactc ttgttcaatt cttttgg

47

<210> 84

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer OAT3 for production of an expression cassette with AOX1 gene promoter and terminator

<400> 84

cccataatgg taccgttagt ggtacgggca gtc

33

<210> 85

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer HGP5 for amplification of a gene conferring resistance against hygromycin B

<400> 85

gtcgacatga aaaagcctga actcaccgc

29

<210> 86

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer HGP3 for amplification of a gene conferring resistance against hygromycin B

<400> 86

actagtctat tcctttgccc tcggacg

27

<210> 87

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplification of 5' -region of  $\alpha$ -mannosidase gene

<400> 87

ggggggtcga catggtggtc ttcagcaaaa ccgctgccc

39

<210> 88

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplification of 5'-region of  $\alpha$ -mannosidase gene

<400> 88

ggggggcggc cgcgtgatgt tgaggttggt gtacggaacc ccc

43

<210> 89

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplification of Sa  
ccharomyces cerevisiae SUC2 gene

<400> 89

ggggactagt atgcttttgc aagctttcct tttccttttg

40

<210> 90

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for amplification of Sa  
ccharomyces cerevisiae SUC2 gene

<400> 90

ccccagatct tatTTtactt cccttacttg gaacttgtc

39

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 711

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 7..711

&lt;400&gt; 91

ctcaccatga gggTccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgca 60  
 cgatgtgaca tccagatgac ccagTctcca tcttccgtgt ctgcatctgt aggagacaga 120  
 gtcaccatca cttgtcgggc gagtcaggTt attagcagct ggTtagcctg gtatcagcag 180  
 aaaccaggga aagccccTaa gTcctgac tatgctgcat ccagTttgca aagtggggTc 240  
 ccatcaaggT tcagcggcag Tggatctggg acagattTca ctctcaccat cagcagcctg 300  
 cagcctgaag atTTtgcaac ttactattgt caacaggcta acagTttccc tccgacgtTc 360  
 ggccaaggga ccaaggTgga aatcaaacgt acggTggctg caccatctgt cttcatctTc 420  
 ccgccatctg atgagcagTt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480  
 ttctatccca gagaggccaa agTacagTgg aaggTggata acgccctcca atcgggTaa 540  
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600  
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagTct acgcctgcga agTcacccat 660  
 cagggcctga gctcgcccgT cacaagagc ttcaacaggg gagagTgttg a 711

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 92

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val

35 40 45

Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn

100 105 110

Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 93

<211> 1428

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> 1..1428

<400> 93

atgggttga gcctcatctt gctcttcctt gtcgctgttg ctacgcgtgt ccagtctgag 60  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtcaagcctg gggggtcctt gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatagcatga actgggtccg ccaggctcca 180  
 gggaaggggc tggagtgggt ctcatccatt agtagtagta gtagttacat atactacgca 240  
 gactcagtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300  
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agatcggtatt 360  
 attatggttc ggggagtcta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 420  
 gtcaccgtct cctcagctag caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480  
 aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540  
 ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600  
 gtcttacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660  
 ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720  
 aagaaagtig agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 780  
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aacccaagga caccctcatg 840  
 atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 900  
 gtcaagtica actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960  
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020  
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1080  
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140  
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200  
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260  
 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1320  
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380  
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1428

<210> 94

<211> 475

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg

1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ile Ile Met Val Arg Gly Val Tyr Tyr

115 120 125

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

130 135 140



Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn  
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp  
370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

450

455

460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

475

【 0 2 6 1 】

## 【配列表フリーテキスト】

配列番号 3 は、Ogataea minuta GAP遺伝子の5' 領域を増幅するためのプライマーPGP5を示す。

配列番号 4 は、Ogataea minuta GAP遺伝子の3' 領域を増幅するためのプライマーPGP3を示す。

配列番号 9 は、Ogataea minuta のGAP遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを作成するためのプライマーを示す。

配列番号 1 0 は、Ogataea minutaのGAP遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを作成するためのプライマーを示す。

配列番号 1 3 は、Ogataea minuta URA3遺伝子の5' 領域を増幅するためのプライマーPUR5を示す。

配列番号 1 4 は、Ogataea minuta URA3遺伝子の3' 領域を増幅するためのプライマーPUR3を示す。

配列番号 1 7 は、Ogataea minutaのURA3遺伝子破壊を行うための、クロラムフェニコール耐性遺伝子の一部を増幅するためのプライマーを示す。

配列番号 1 8 は、Ogataea minutaのURA3遺伝子破壊を行うための、クロラムフェニコール耐性遺伝子の一部を増幅するためのプライマーを示す。

配列番号 1 9 は、Ogataea minutaのURA3遺伝子破壊を確認するためのプライマーDU5を示す。

配列番号 2 0 は、Ogataea minutaのURA3遺伝子破壊を確認するためのプライマーDUC5を示す。

配列番号 2 1 は、Ogataea minutaのURA3遺伝子破壊を確認するためのプライマーDU3を示す。

配列番号 2 2 は、Ogataea minutaのURA3遺伝子破壊を確認するためのプライマ

ーDUC3を示す。

配列番号 2 5 は、Ogataea minuta ADE1遺伝子の5' 領域を増幅するためのプライマー-PAD5を示す。

配列番号 2 6 は、Ogataea minuta ADE1遺伝子の3' 領域を増幅するためのプライマー-PAD3を示す。

配列番号 2 9 は、URA3構造遺伝子上流領域を増幅するための、URA3構造遺伝子の5' 側のプライマーを示す。

配列番号 3 0 は、URA3構造遺伝子上流領域を増幅するための、URA3構造遺伝子の3' 側のプライマーを示す。

配列番号 3 1 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を行うためのプライマー-Da d1-5を示す。

配列番号 3 2 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を行うためのプライマー-Da d1-3を示す。

配列番号 3 3 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を行うためのプライマー-Da d2-5を示す。

配列番号 3 4 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を行うためのプライマー-Da d2-5を示す。

配列番号 3 5 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を確認するためのプライマー-DA5を示す。

配列番号 3 6 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を確認するためのプライマー-DA3を示す。

配列番号 3 7 は、Ogataea minutaのADE1遺伝子破壊を確認するためのプライマー-DOU5を示す。

配列番号 4 0 は、Ogataea minuta OCH1遺伝子の5' 領域を増幅するためのプライマー-POH5を示す。

配列番号 4 1 は、Ogataea minuta OCH1遺伝子の3' 領域を増幅するためのプライマー-POH3を示す。

配列番号 4 4 は、Ogataea minutaのOCH1遺伝子破壊を確認するためのプライマー-DO3を示す。

配列番号 4 5 は、Ogataea minuta の OCH1 遺伝子破壊を確認するためのプライマー-D05を示す。

配列番号 4 6 は、Ogataea minuta の OCH1 遺伝子破壊を確認するためのプライマー-D03-2を示す。

配列番号 4 9 は、Ogataea minuta PEP4 遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマー-PPA5を示す。

配列番号 5 0 は、Ogataea minuta PEP4 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー-PPA3を示す。

配列番号 5 5 は、Ogataea minuta PRB1 遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマー-PPB5を示す。

配列番号 5 6 は、Ogataea minuta PRB1 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー-PPB3を示す。

配列番号 6 1 は、Ogataea minuta KTR1 遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマー-PKR5を示す。

配列番号 6 2 は、Ogataea minuta KTR1 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー-PKR3を示す。

配列番号 6 7 は、Ogataea minuta MNN9 遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマー-PMN5を示す。

配列番号 6 8 は、Ogataea minuta MNN9 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー-PMN3を示す。

配列番号 7 1 は、プライマー-DMN5を示す。

配列番号 7 2 は、プライマー-DMN3を示す。

配列番号 7 5 は、Ogataea minuta AOX1 遺伝子の 5' 領域を増幅するためのプライマー-PAX5を示す。

配列番号 7 6 は、Ogataea minuta AOX1 遺伝子の 3' 領域を増幅するためのプライマー-PAX3を示す。

配列番号 8 1 は、AOX1 遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを作成するためのプライマー-OAP5を示す。

配列番号 8 2 は、AOX1 遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセッ

トを作成するためのプライマー0AP3を示す。

配列番号83は、AOX1遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを作成するためのプライマー0AT5を示す。

配列番号84は、AOX1遺伝子プロモーター、ターミネーターによる発現カセットを作成するためのプライマー0AT3を示す。

配列番号85は、ハイグロマイシンB耐性遺伝子を増幅するためのプライマーHGP5を示す。

配列番号86は、ハイグロマイシンB耐性遺伝子を増幅するためのプライマーHGP3を示す。

配列番号87は、 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子の5'領域を増幅するためのプライマーを示す。

配列番号88は、 $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子の5'領域を増幅するためのプライマーを示す。

配列番号89は、Saccharomyces cerevisiae SUC2遺伝子を増幅するためのプライマーを示す。

配列番号90は、Saccharomyces cerevisiae SUC2遺伝子を増幅するためのプライマーを示す。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

哺乳類動物での一般的なN-結合型糖鎖の生合成経路を示す。

##### 【図2】

酵母 (S. cerevisiae) におけるN-結合型糖鎖の生合成経路を示す。図中、Mはマンノース、 $\alpha 2$ は $\alpha$ -1,2結合、 $\alpha 3$ は $\alpha$ -1,3結合、 $\alpha 6$ は $\alpha$ -1,6結合、および $\beta 4$ は $\beta$ -1,4結合を意味する。

##### 【図3】

種々の酵母の細胞壁糖鎖のプロトンNMR分析結果を示したものである。

##### 【図4】

各種酵母の細胞壁由来マンノプロテインから調製した糖鎖をAspergillus saitoi  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ（生化学工業製）により消化しHPLC（アミドカラム）

で分析した結果である。

【図 5】

プラスミド pOMGP1、pOMGP2、pOMGP3、および pOMGP4 の制限酵素地図を示したものである。

【図 6】

プラスミド pOMUR1、pOMUM1、および pDOMU1 の制限酵素地図を示したものである。

【図 7】

Ogataea minuta 野生株、プラスミド pDOMU1 による形質転換株、URA3 遺伝子破壊株の URA3 遺伝子座の構造、及び PCR プライマーの位置を示したものである。

【図 8】

プラスミド pOMAD1、および pDOMAD1 の制限酵素地図を示したものである。なお、人為的に付加した制限酵素部位には下線を施した。

【図 9】

プラスミド pOMUR2、および pROMU1 の制限酵素地図を示したものである。

【図 10】

Ogataea minuta 野生株、プラスミド pDOMAD1 による ADE1 遺伝子破壊株、および URA3 遺伝子欠失株の ADE1 遺伝子座の構造、及び PCR プライマーの位置を示したものである。

【図 11】

プラスミド pOMOC1、pOMOC2B、pOMOC3H、および pDOMOCH1 の制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

【図 12】

Ogataea minuta 野生株、プラスミド pDOMOCH1 による OCH1 遺伝子破壊株、および URA3 遺伝子欠失株の OCH1 遺伝子座の構造、及び PCR プライマーの位置を示したものである。

【図 13】

OCH1 遺伝子破壊株である Ogataea minuta TK3-A 株及び親株である Ogataea minuta TK1-3 株のマンナン糖蛋白質糖鎖のアミドカラム及び逆相カラムでの構造分析

結果を示したものである。

【図 1 4】

プラスミド pOMPA1、pDOMPA1 の制限酵素地図、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミド pDOMPA1 による PEP4 遺伝子破壊株、及び URA3 遺伝子欠失株の PEP4 遺伝子座の構造を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

【図 1 5】

プラスミド pOMPBI、pDOMPBI の制限酵素地図、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミド pDOMPBI による PRB1 遺伝子破壊株、及び URA3 遺伝子欠失株の PRB1 遺伝子座の構造を示したものである。

【図 1 6】

プラスミド pOMKR1、pDOMKR1 の制限酵素地図、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミド pDOMKR1 による KTR1 遺伝子破壊株、及び URA3 遺伝子欠失株の KTR1 遺伝子座の構造を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

【図 1 7】

プラスミド pOMMN9-1、pDOMN9 の制限酵素地図、*Ogataea minuta* 野生株、プラスミド pDOMN9 による MNN9 遺伝子破壊株、URA3 遺伝子欠失株の MNN9 遺伝子座の構造、及び PCR プライマーの位置を示したものである。

【図 1 8 A】

プラスミド pOMAX1、pOMAXPT1、pOMUR5、pOMUR6、pOMUR-X、pOMUR-XN、pOMex1U、pOMex2U、pOMex3G、pOMex4A、pOMex5H、pOMexGP1U および pOMexGP4A の制限酵素地図を示したものである。なお、ベクター由来の制限酵素部位には下線を施した。

【図 1 8 B】

図 1 8 A の続き

【図 1 9】

*Aspergillus saitoi* 由来  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現している och1  $\Delta$  株である *Ogataea minuta* TK3-A-MU1 株のマンナン糖蛋白質糖鎖のアミドカラム及



び逆相カラムでの構造分析結果を示したものである。

【図 20】

Aspergillus saitoi 由来  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼ遺伝子発現 Ogataea minuta 0 CH1 遺伝子破壊株 Ogataea minuta TK3-A-MU-IVG1 株の産生する Saccharomyces cerevisiae 由来 インペルターゼのアミドカラム及び逆相カラムでの糖鎖構造解析の結果を示したものである。

【図 21】

Ogataea minuta TK9-IgB-aM 株を用いて生産された抗体のウエスタン解析結果を示す。

【図 22】

Ogataea minuta TK9-IgB-aM 株を用いて生産された抗体の精製結果を示す。

【図 23】

Ogataea minuta TK9-IgB-aM 株を用いて生産された抗体の G-CSF に対する結合活性を示す。

【図 24】

Ogataea minuta TK9-IgB 株、及び Ogataea minuta TK9-IgB-aM 株を用いて生産された抗体の糖鎖構造解析結果を示す。

【符号の説明】

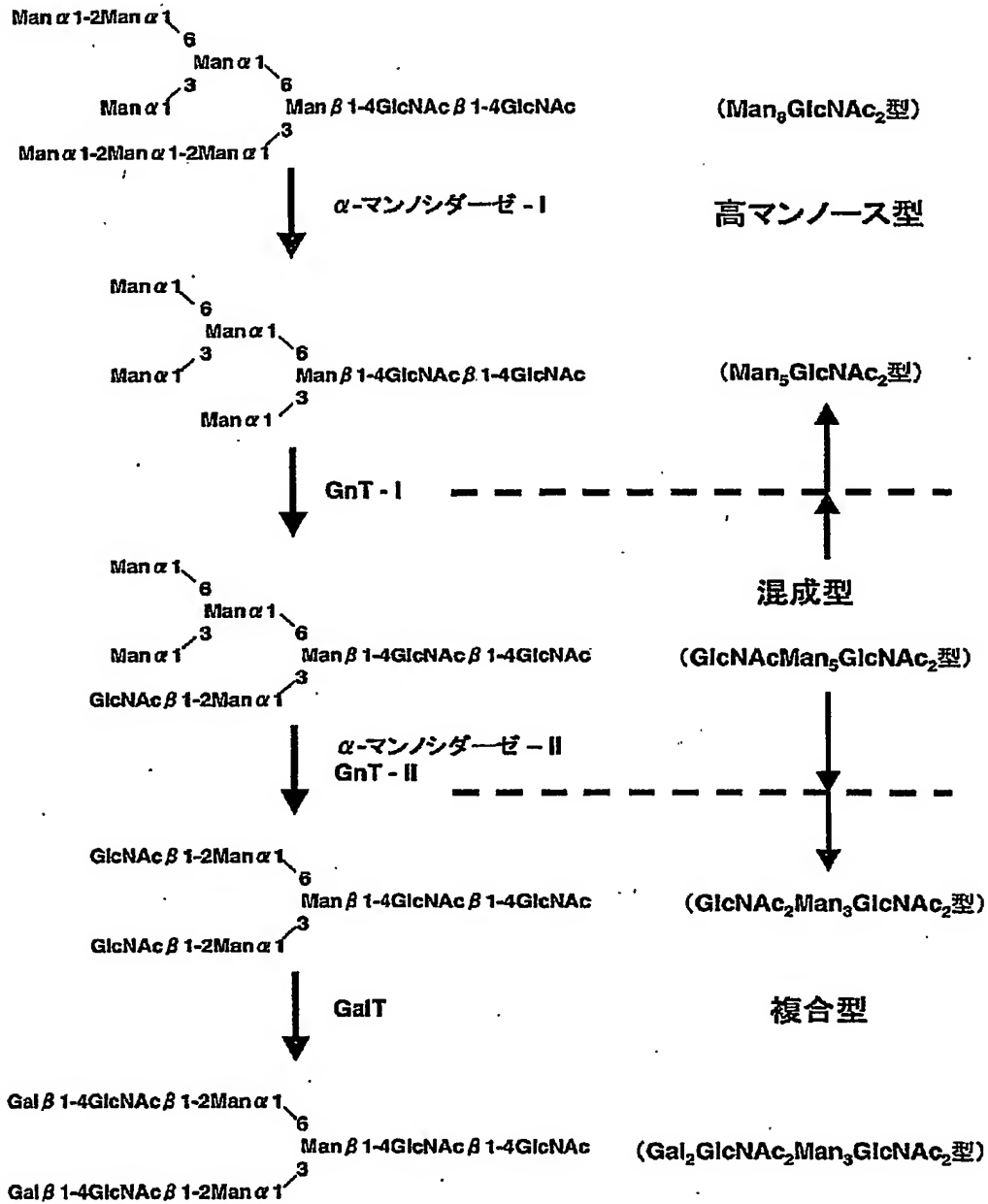
GlcNAc, GN : N-アセチルグルコサミン

Man, M : マンノース

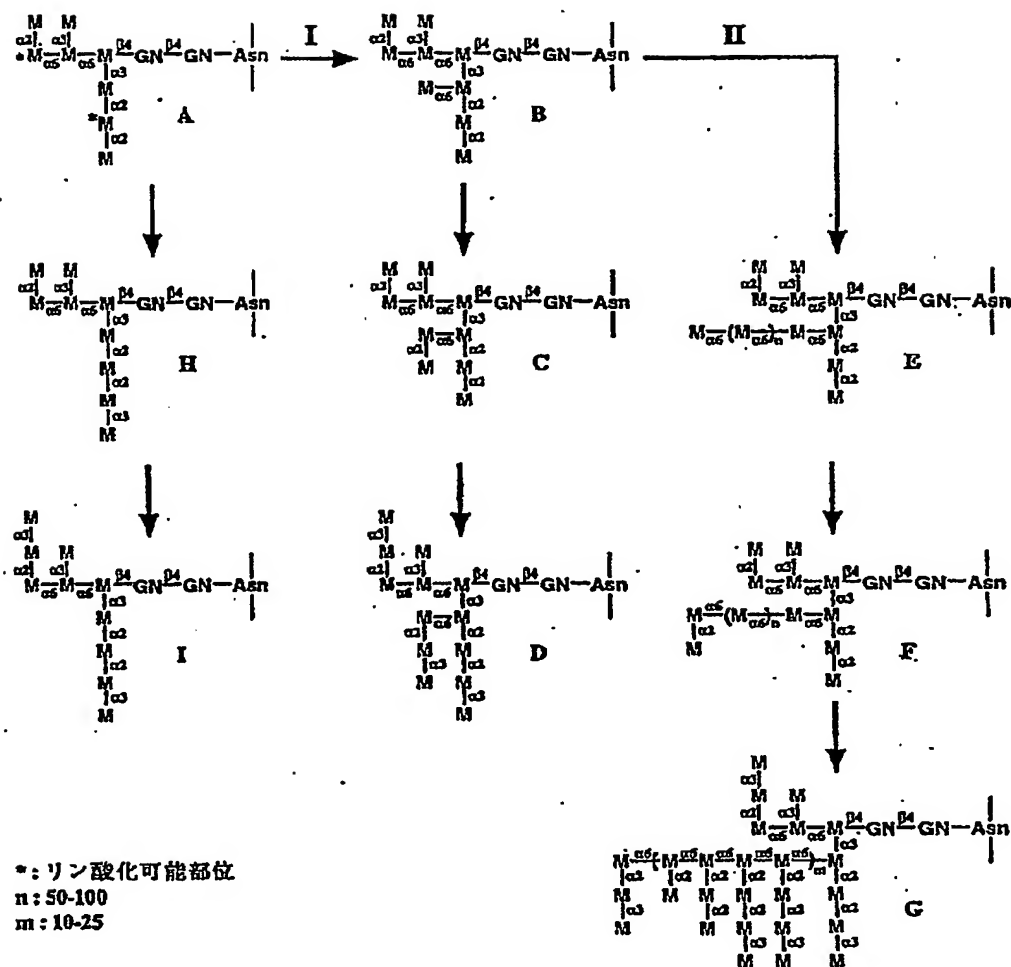
PA : 2-アミノピリジル化

【書類名】 図面

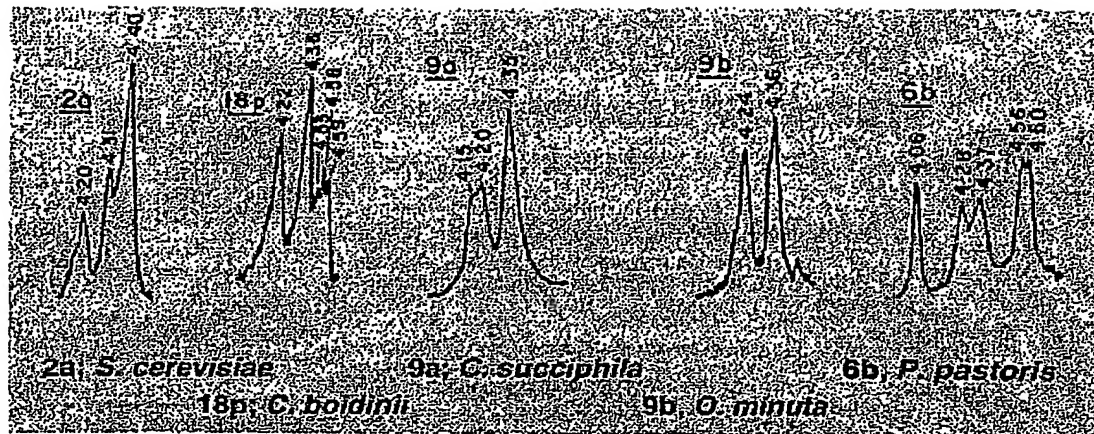
【図 1】



【図2】



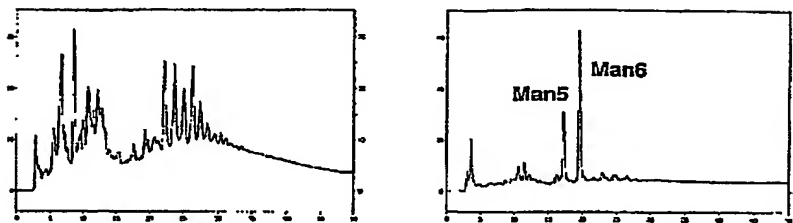
【図3】



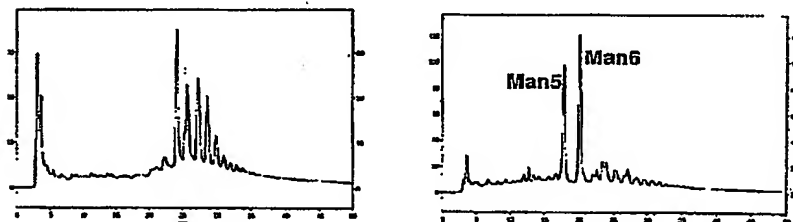
【図4】

$\alpha$ -1,2マンノシダーゼ  
処理前                      処理後

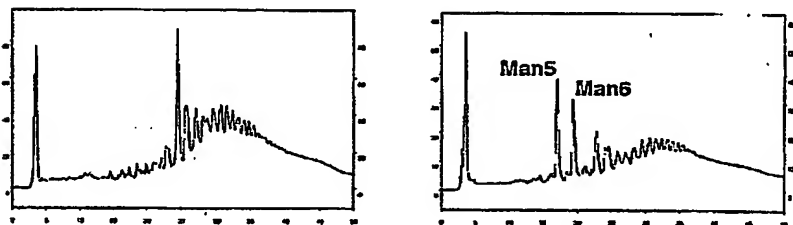
*Ogataea minuta*



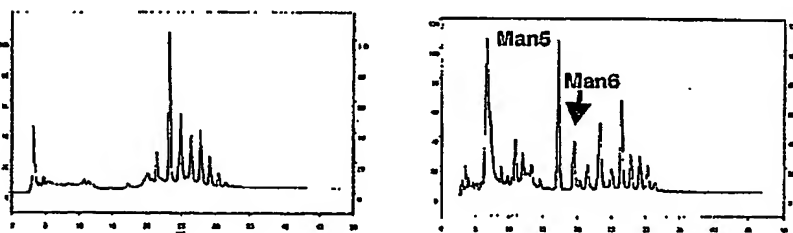
*Candida succiphila*



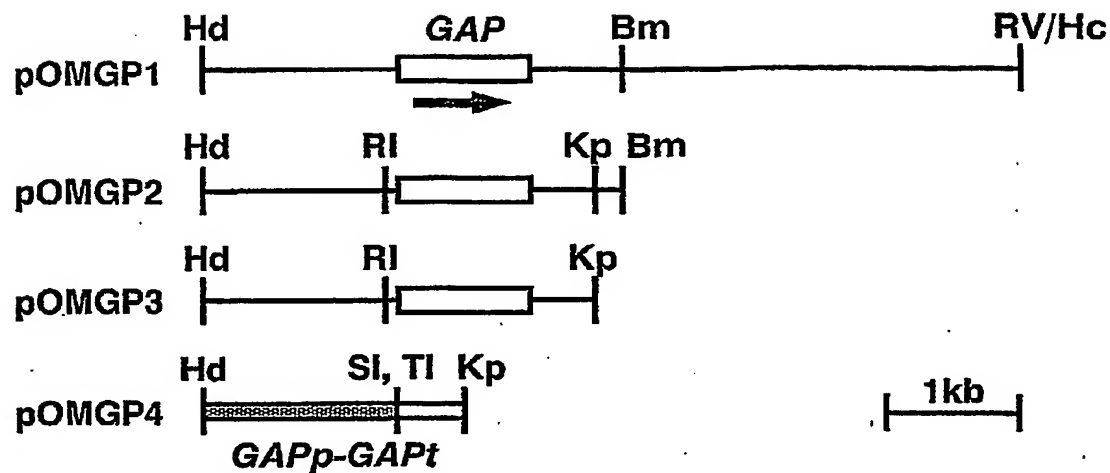
*Candida boidinii*



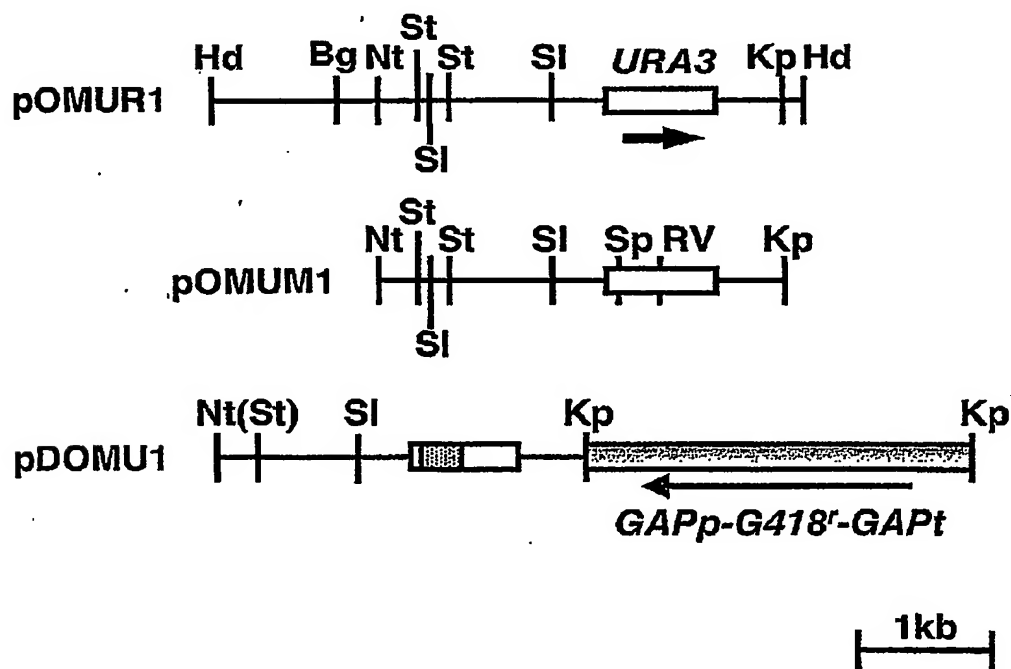
*Saccharomyces cerevisiae*



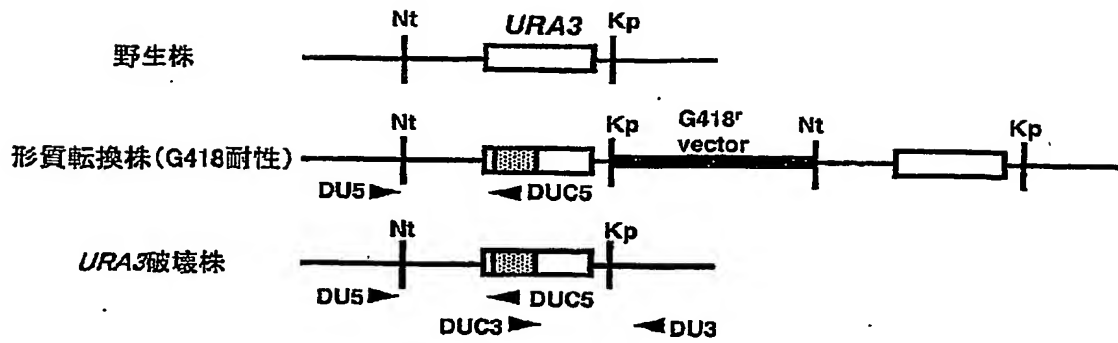
【図 5】



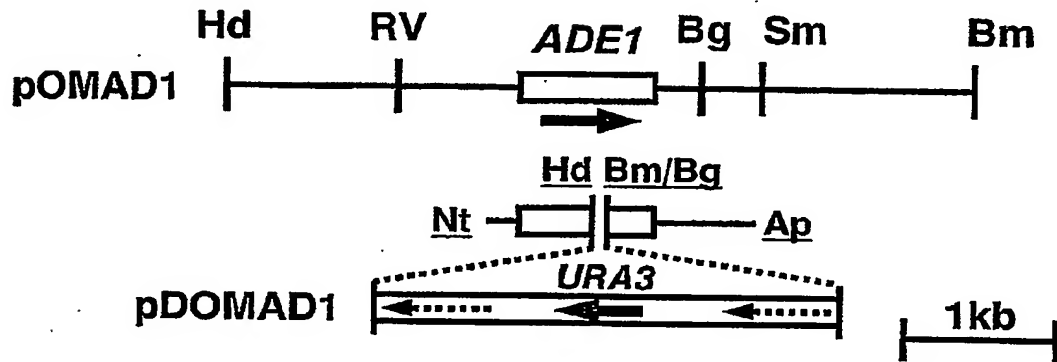
【図 6】



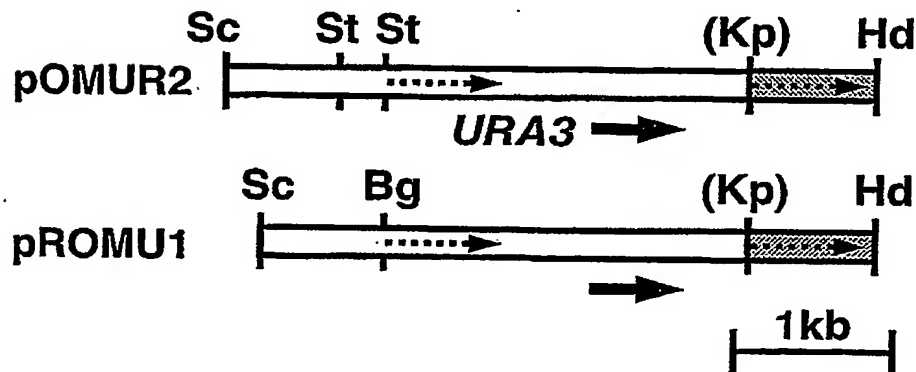
【図 7】



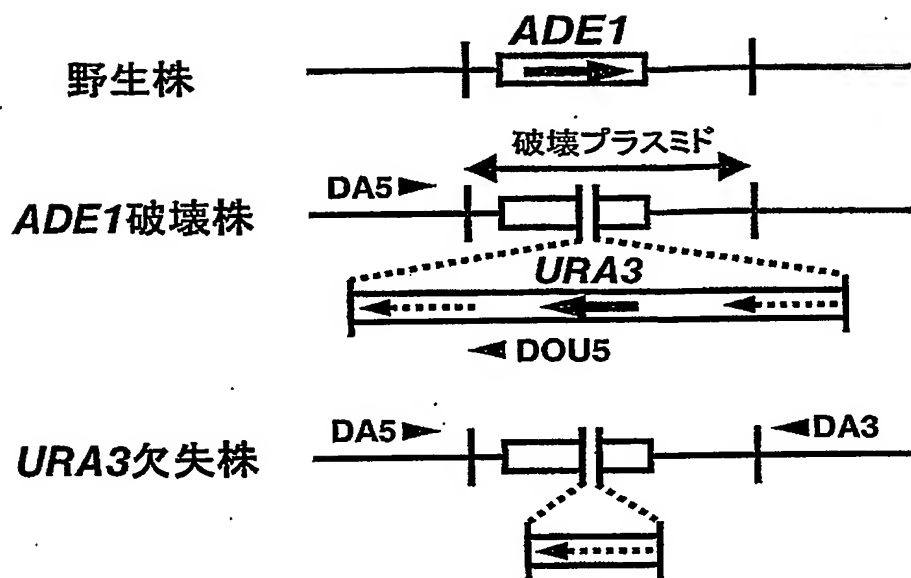
【図 8】



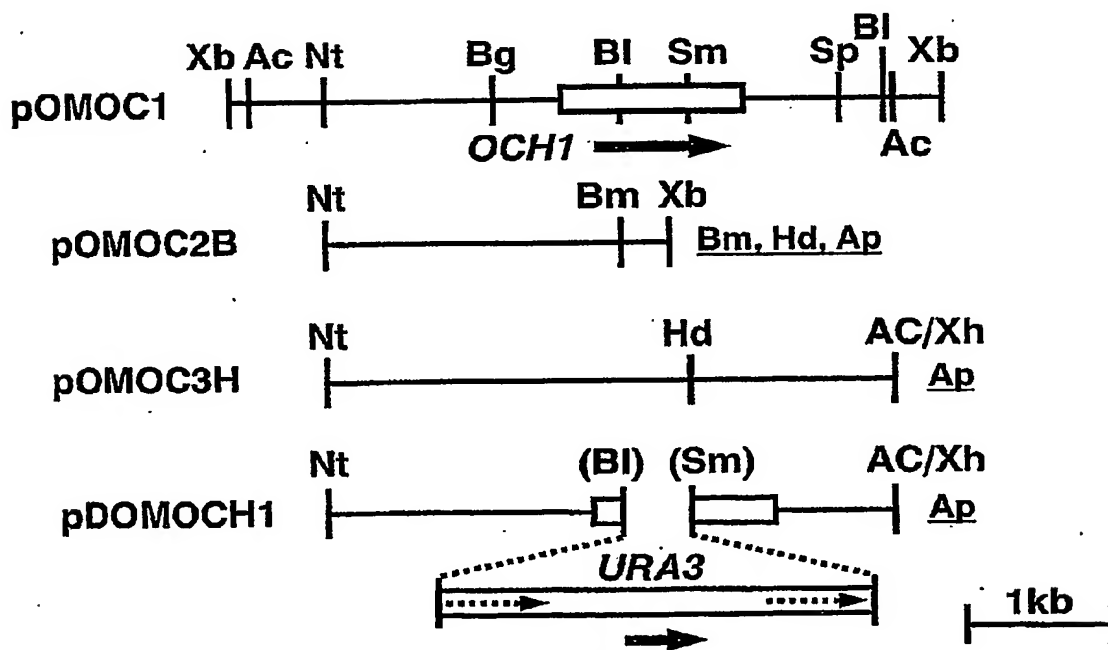
【図 9】



【図10】

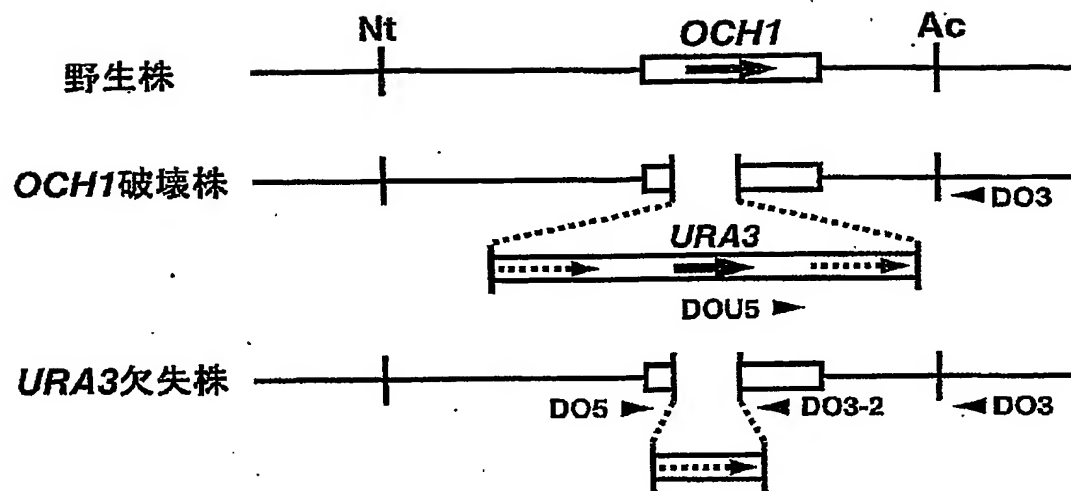


【図11】

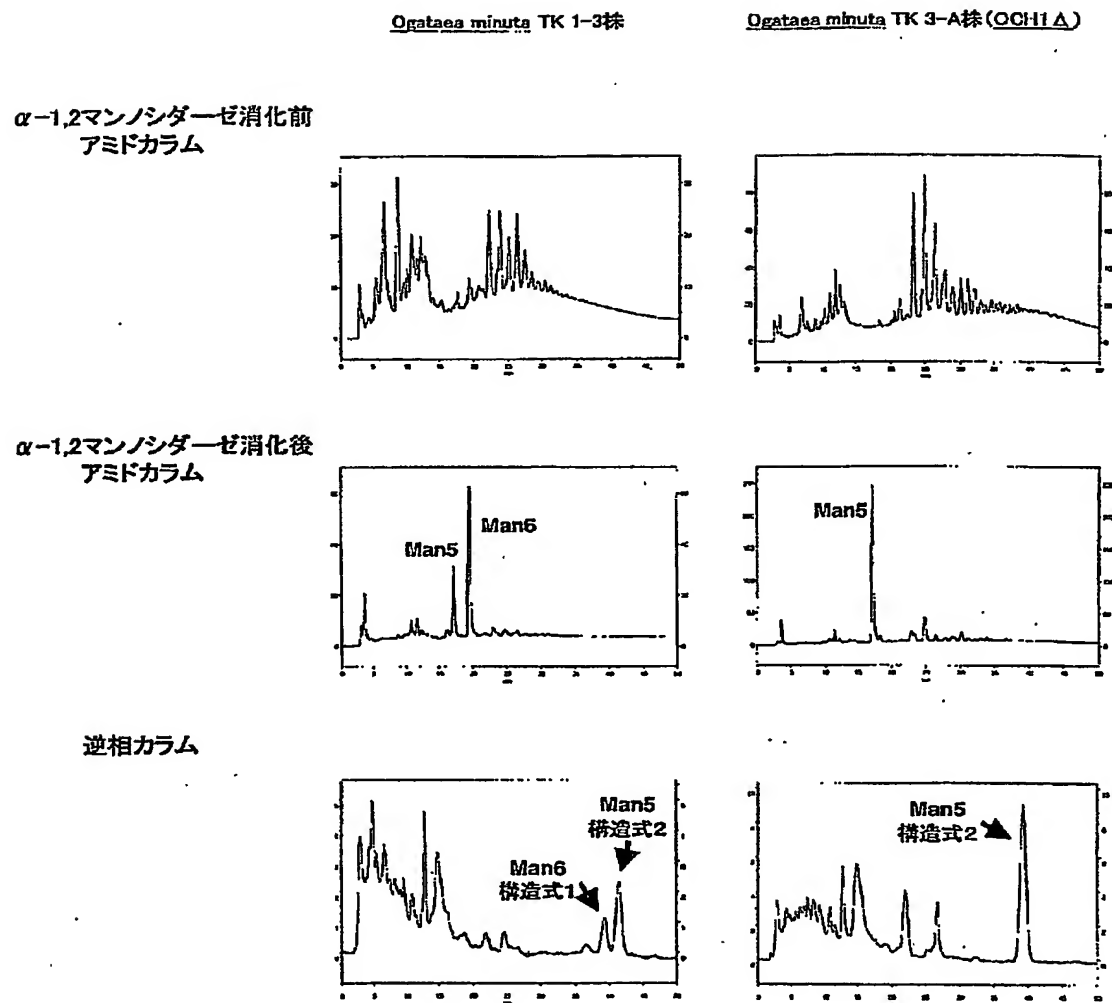




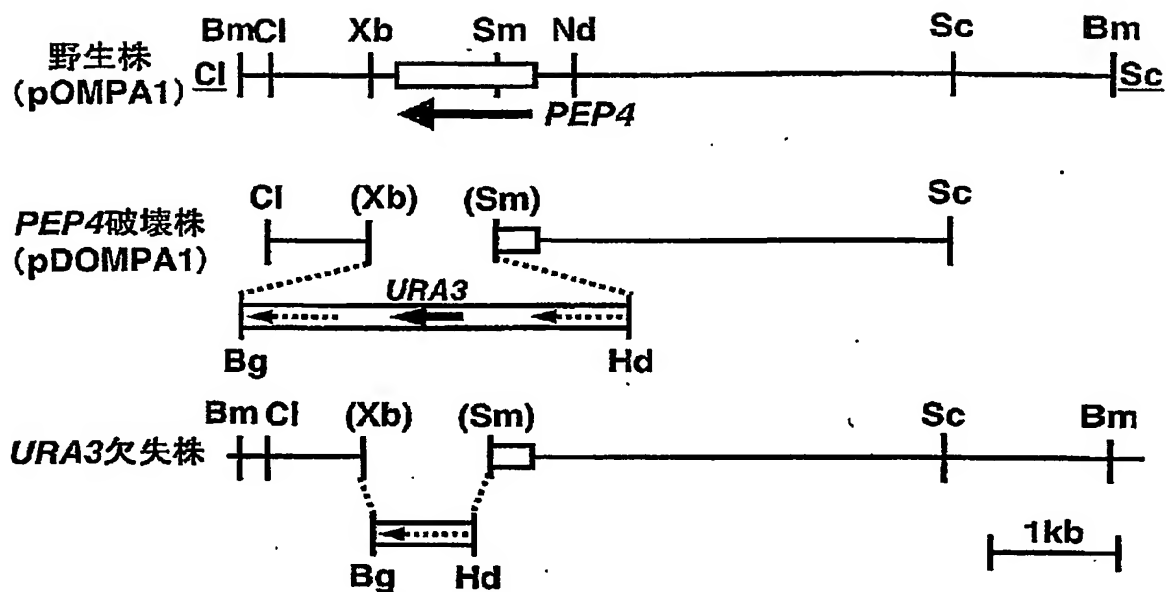
【図 12】



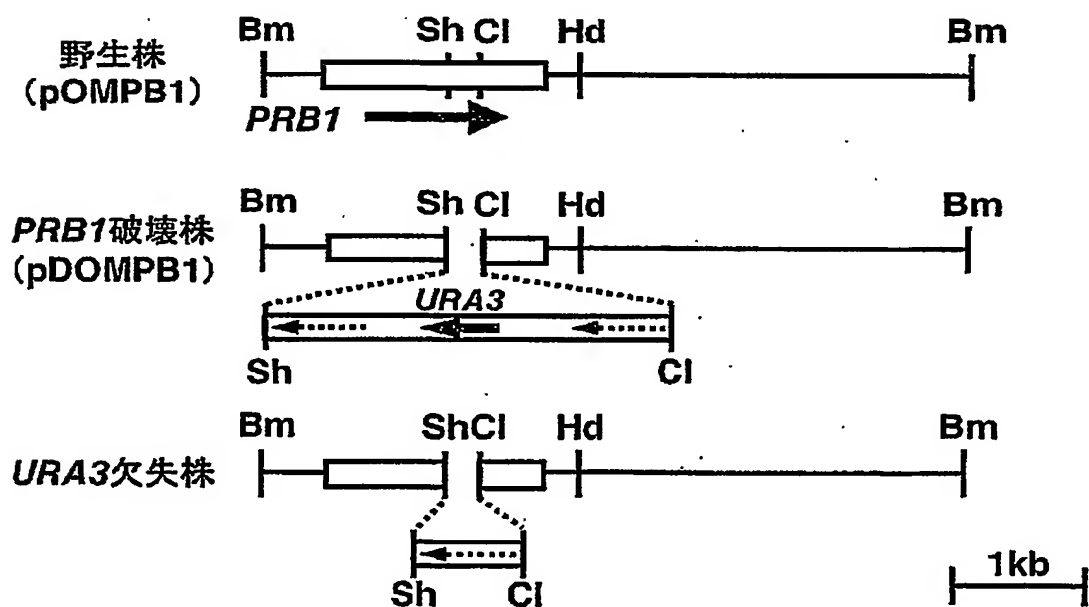
【図 13】



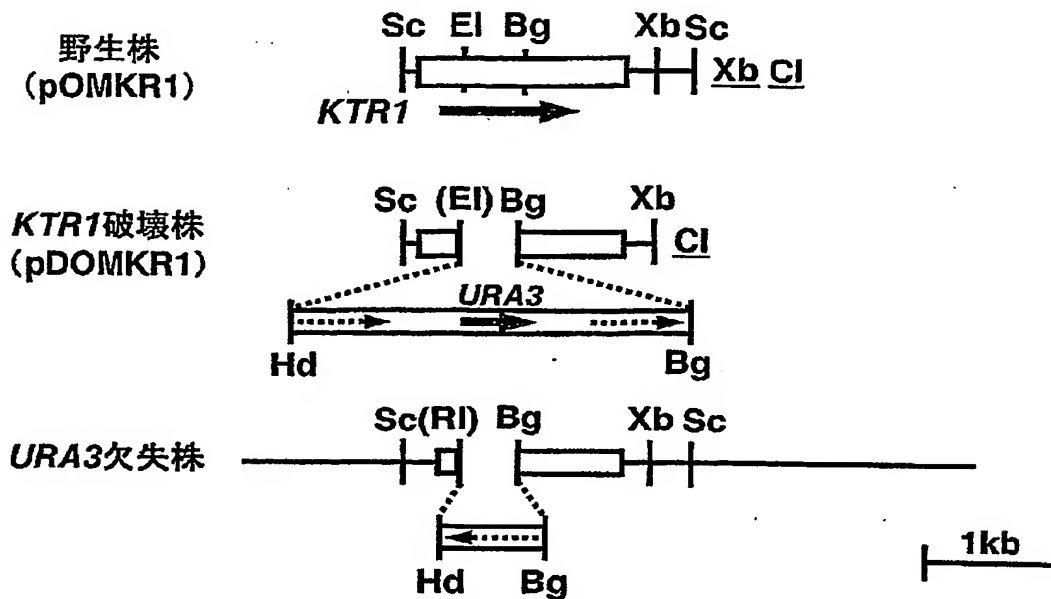
【図 14】



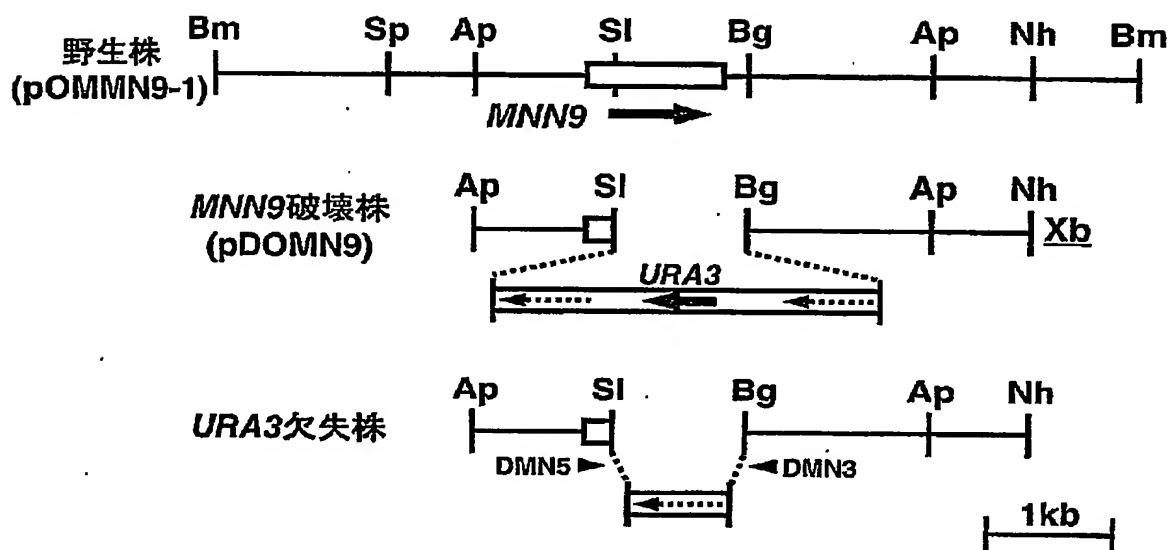
【図 15】



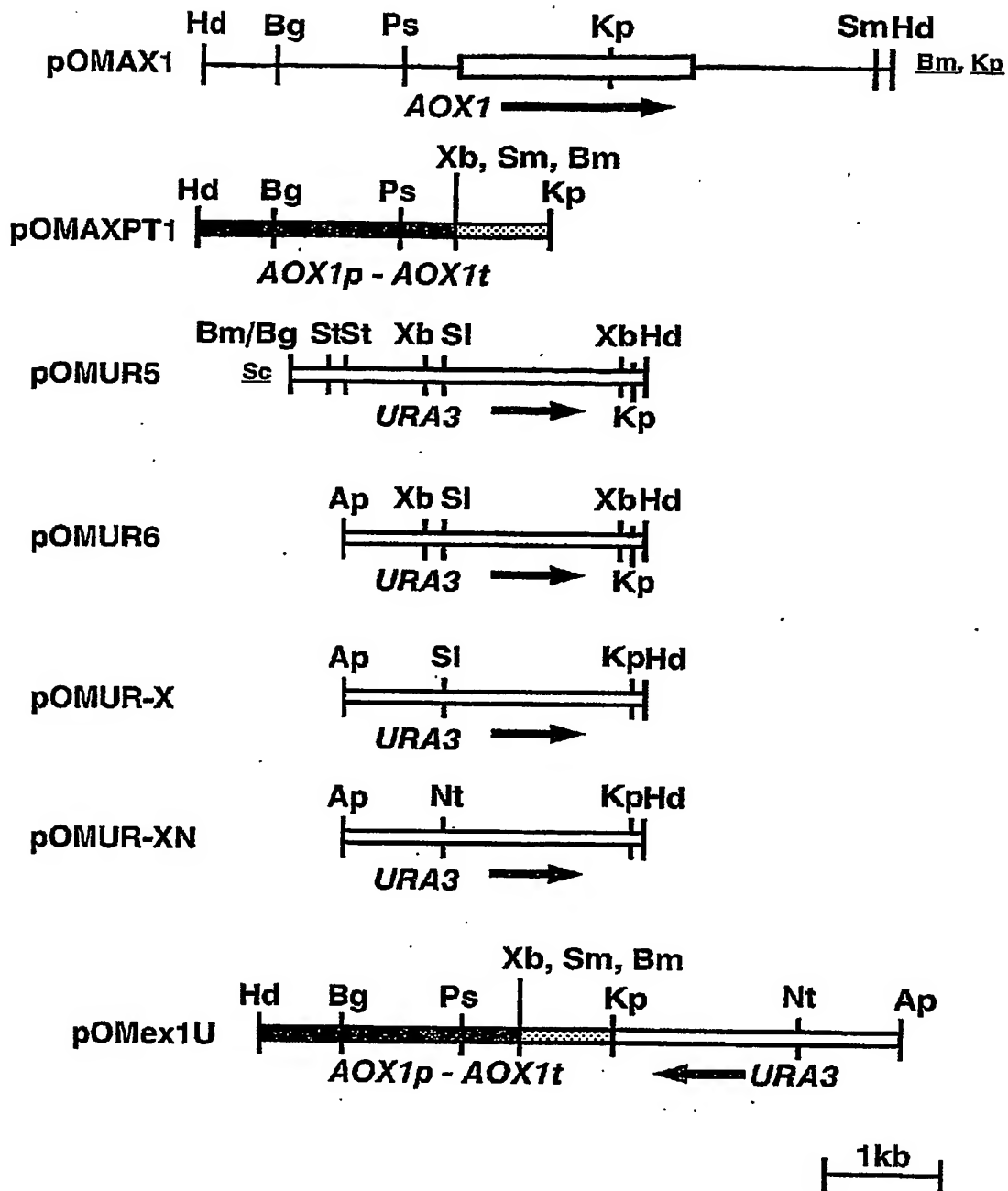
【図 16】



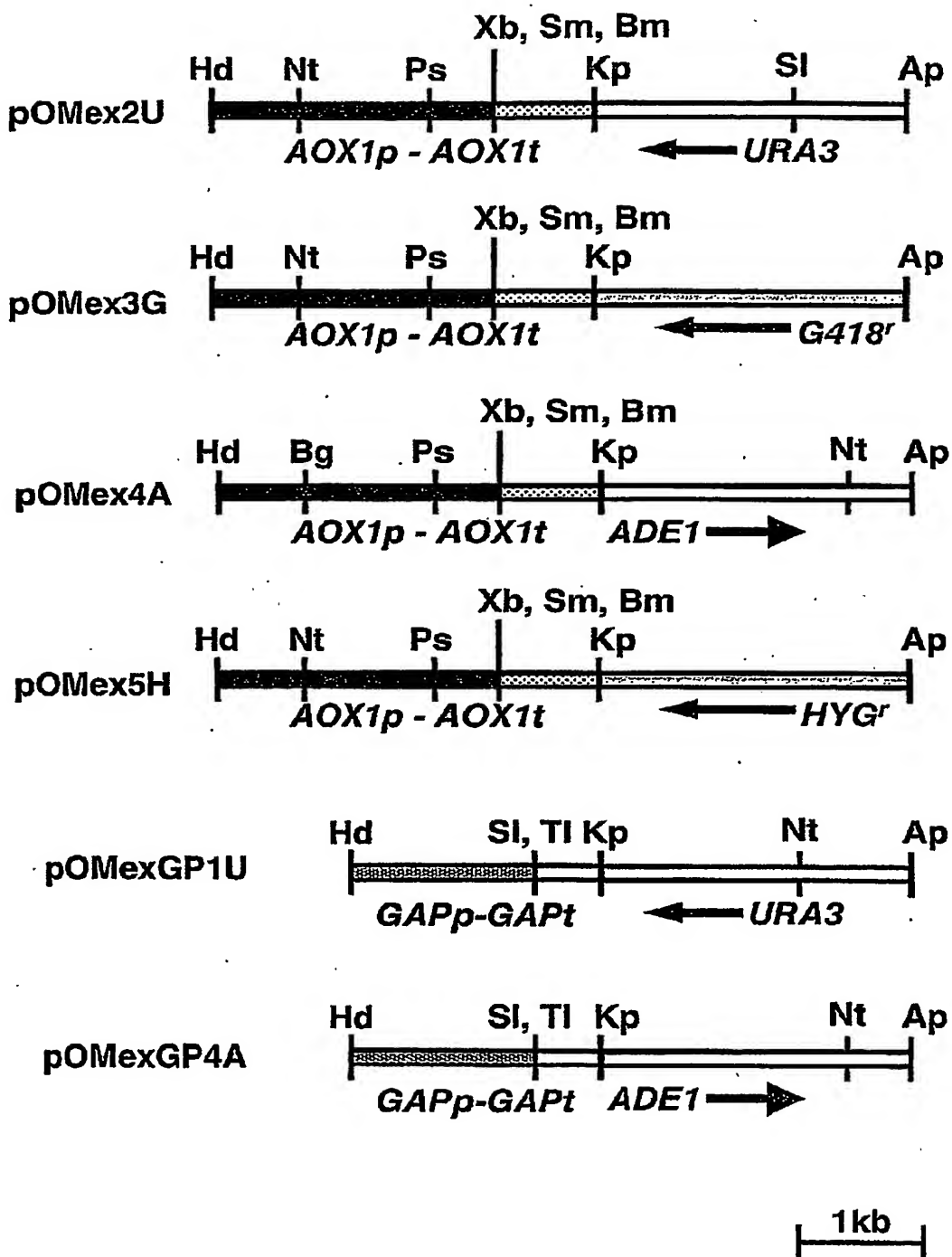
【図 17】



【図18A】

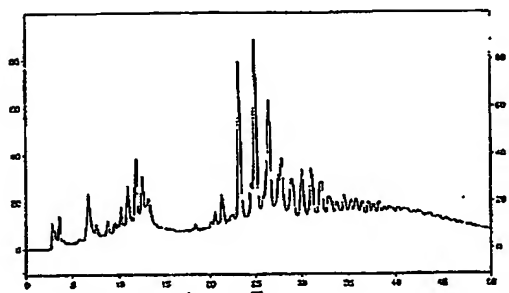


【図 18 B】

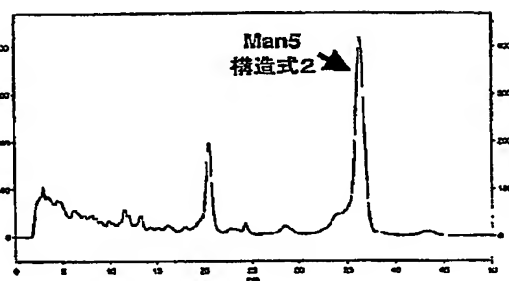
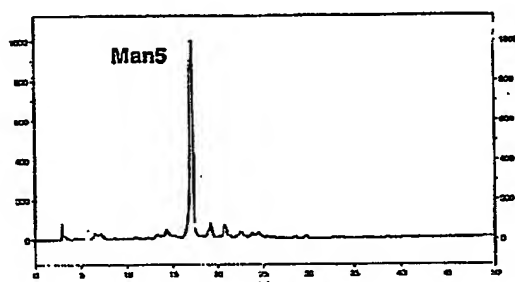


【図 19】

Ogataea minuta TK3-A( $\Delta och1$ )株  
アミドカラム

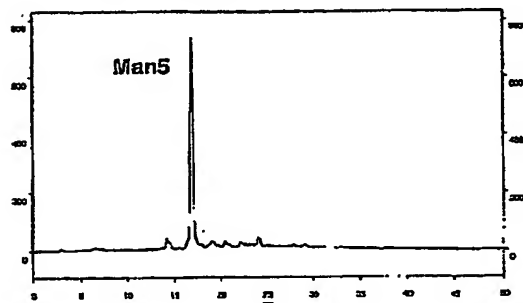


Ogataea minuta TK3-A( $\Delta och1 + \alpha$ -1,2マンノシダーゼ)株  
アミドカラム 逆相カラム

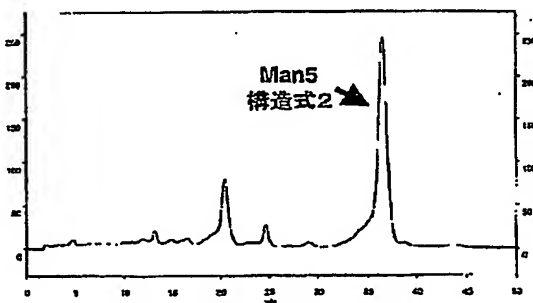


【図 20】

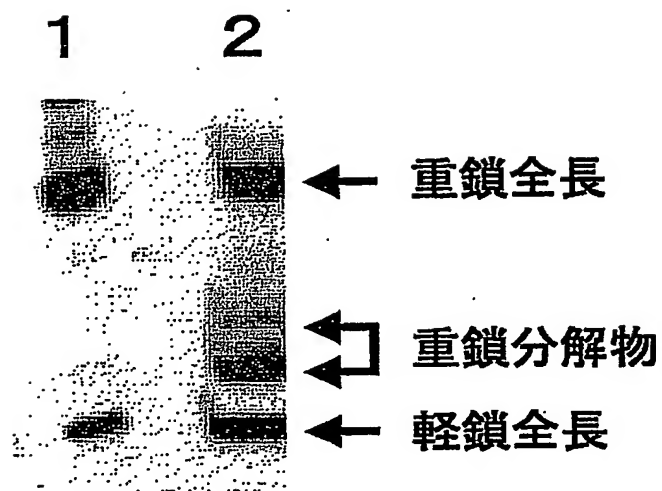
アミドカラム



逆相カラム



【図 2 1】

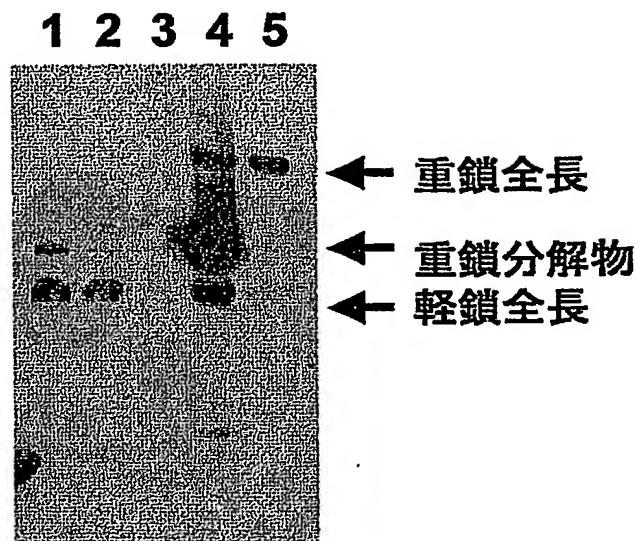


1: コントロール抗体

2: Ogataea minuta TK9-IgB-aM株の生産する抗体



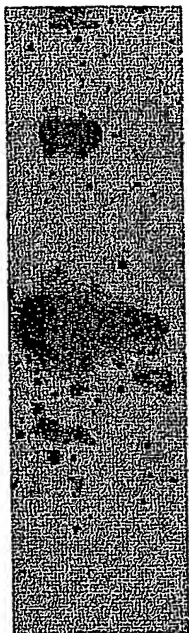
【図 22】



1. 培養上清
2. カラム非吸着画分
3. 洗浄液画分
4. 溶出画分
5. コントロール抗体

【図23】

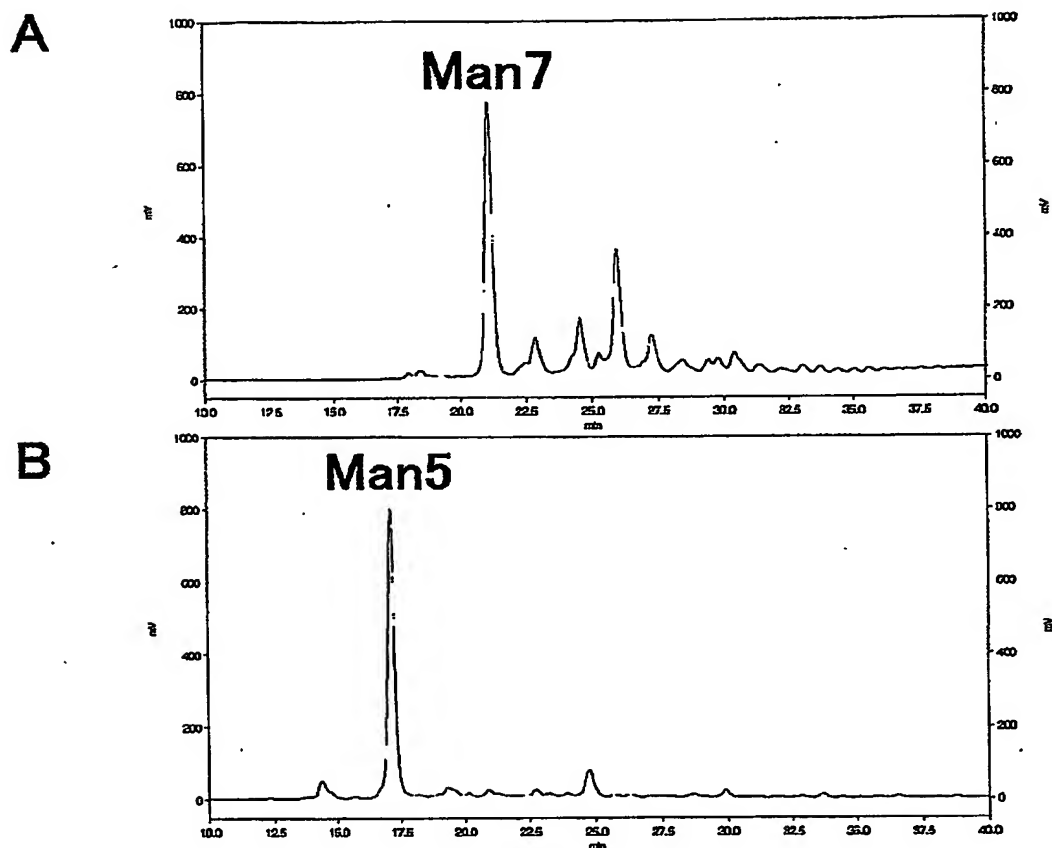
1 2



1. コントロール抗体

2. Ogataea minuta TK9-IgB-aM株の生産する抗体

【図 2 4】



A. *Ogataea minuta* TK9-IgB株

B. *Ogataea minuta* TK9-IgB-aM株

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メチロトロフ酵母を用いて抗原性のない哺乳類型糖蛋白質を大量に製造する方法を提供すること。

【解決手段】 メチロトロフ酵母の糖鎖生合成系酵素遺伝子変異株に強力なプロモーターの支配下にて $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼを導入・発現させ、更に目的の糖蛋白質遺伝子を導入したメチロトロフ酵母細胞を培地に培養し、培養物より哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質を得ることを特徴とする、哺乳類型糖鎖を有する糖蛋白質の製造方法。

【効果】 本発明による遺伝子工学的手法により新規に育種した糖鎖変異メチロトロフ酵母を用い、ヒトなど哺乳類細胞の生産するハイマンノース型と同一の中性糖鎖、あるいは同一の中性糖鎖を有する糖蛋白質を多量かつ純度よく生産することができる。また更に当該変異株に哺乳類型糖鎖の生合成系遺伝子を導入することにより、ハイブリッド型、複合型等の哺乳類型糖鎖、あるいは哺乳類型糖鎖を有する蛋白質を効率的に生産することができる。本発明における酵母株、糖蛋白質は医薬品などに利用することができる。

【選択図】 図 2 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000253503]

1. 変更年月日 1995年 6月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区新川二丁目10番1号

氏 名 麒麟麦酒株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所